

SEMIKONSERVATIVE
UND UNPROGRAMMIERTE
(REPARATURBEDINGTE)
DESOXYRIBONUCLEINSÄURE-
SYNTHESE IN THYMUS- UND
KNOCHENMARKSZELLEN DER RATTE
UNTER DEM EINFLUSS VON
DIÄTHYLDITHIOCARBAMAT
(DDC)

Alfred Spath

Diss
München
1905



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554624_0018

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und
Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Kommissarischer Vorstand: Prof.Dr. W. Leidl

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof.Dr. K. Tempel

SEMIKONSERVATIVE UND UNPROGRAMMIERTE
(REPARATURBEDINGTE) DESOXYRIBONUCLEINSÄURE-
SYNTHES IN THYMUS- UND KNOCHENMARKSZELLEN
DER RATTE UNTER DEM EINFLUSS VON
DIÄTHYLDITHIOCARBAMAT (DDC)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Alfred Spath
aus
Beckingen

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl
Referent: Prof. Dr. K. Tempel
Korreferent: Prof. Dr. H.P. Jennissen

Tag der Promotion: 26.Juli 1985

Meinem Vater

INHALTSVERZEICHNIS

1.	PROBLEMSTELLUNG	1
2.	EINLEITUNG	3
2.1.	<u>DNA-Synthese</u>	3
2.2.	<u>DNA-Reparatur</u>	5
2.2.1.	Präreplikative Reparatur	8
2.2.1.1.	Photoreaktivierung	8
2.2.1.2.	Strangbruchreparatur	8
2.2.1.3.	Basenexcision	8
2.2.1.4.	Nucleotidexcision	9
2.2.1.5.	Dealkylierung von DNA-Basen (z.B. O ⁶ -Methylguanin)	11
2.2.2.	Postreplikative Reparatur	11
2.2.2.1.	SOS-Reparatur	12
2.2.2.2.	Plasmidkontrollierte Reparatur	12
2.3.	<u>Diäthylthiocarbamat (DDC)</u>	13
2.3.1.	Pharmakokinetik	13
2.3.2.	Alkoholismustherapie	15
2.3.3.	Neurotransmitter	15
2.3.4.	Immunologie	16
2.3.5.	Anticancerogene Effekte	17
2.3.6.	Zytoprotektive Effekte	18
2.3.7.	Hyperthermie	19
2.3.8.	Superoxiddismutase (SOD)	19
2.3.9.	Mikrosomale Mischoxidasen	21
2.3.10.	Glutathionperoxidase und Katalase	22
2.3.11.	Cytochromoxidase	22
2.3.12.	Metallkomplexierung	22
2.3.13.	Strahlenexposition	23
3.	MATERIAL UND METHODIK	26
3.1.	<u>Reagentien</u>	26

3.2.	<u>Tiermaterial</u>	31
3.3.	<u>Versuchsmethoden</u>	31
3.3.1.	Behandlung der Tiere	31
3.3.1.1.	Injektionen	31
3.3.1.2.	Ganzkörperröntgenbestrahlung	32
3.3.2.	Herstellen der Zellsuspensionen	32
3.3.3.	Semikonservative DNA-Synthese (SDS)	35
3.3.3.1.	In vitro-Markierung der DNA mit ^3H -Thymidin (^3H -dT)	35
3.3.3.2.	In vivo-Markierung der DNA mit ^3H -Thymidin (^3H -dT)	37
3.3.4.	Unprogrammierte DNA-Synthese (UDS)	37
3.3.5.	RNA-Synthese	39
3.3.6.	Isotopenverdünnungsanalyse	39
3.3.7.	Nucleoidsedimentation	41
3.3.8.	Intrazelluläre ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metabolitenkonzentration und ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metaboliten-Rücktransport	42
3.3.9.	Phosphorylierungsmuster	44
3.3.10.	DNA-Konzentration	45
3.3.10.1.	Photometrische Messung	45
3.3.10.2.	Fluorimetrische Messung	45
3.3.11.	Überprüfung der ^3H -dT-Charge	47
3.4.	<u>Auswertung der Ergebnisse</u>	48
3.4.1.	Markierungsmethoden	48
3.4.2.	Nucleoidsedimentation	49
3.5.	<u>Statistische Auswertung und graphische Darstellung</u>	49
3.5.1.	Mittelwert und Standardabweichung	49
3.5.2.	Signifikanzanalyse	49
3.5.3.	Lineare Regression	49
4.	ERGEBNISSE	50
4.1.	<u>Versuche zur Methodik</u>	50
4.1.1.	Einfluß der Inkubationszeit auf die Zellkonzentration	50

4.1.2.	Semikonservative DNA-Synthese	51
4.1.2.1.	^3H -dT-Einbau in Abhängigkeit von der Zellkonzentration	51
4.1.2.2.	^3H -dT-Einbau in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	52
4.1.2.3.	^3H -dT-Einbau in Abhängigkeit von der UV-Dosis	53
4.1.3.	Unprogrammierte DNA-Synthese	54
	^3H -dT-Einbau in Abhängigkeit von der UV-Dosis	54
4.1.4.	Isotopenverdünnung	58
4.1.5.	Nucleoidsedimentation	59
4.1.6.	DNA-Konzentration	60
4.1.6.1.	Photometrische DNA-Messung	60
4.1.6.2.	Fluorimetrische DNA-Messung	63
4.1.7.	Überprüfung der ^3H -dT-Charge	64
4.2.	<u>Festlegung der Versuchsbedingungen</u>	66
4.2.1.	Zellsuspensionen	66
4.2.2.	Inkubationsmedium	66
4.2.3.	Semikonservative DNA-Synthese	67
4.2.3.1.	In vitro-Markierung	67
4.2.3.2.	In vivo-Markierung	67
4.2.4.	Unprogrammierte DNA-Synthese	68
4.2.5.	RNA-Synthese	68
4.2.6.	Isotopenverdünnungsanalyse	69
4.2.7.	Nucleoidsedimentation	69
4.2.8.	Intrazelluläre ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metabolitenkonzentration und ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metaboliten-Rücktransport	69
4.2.9.	Phosphorylierungsmuster	70
4.2.10.	DNA-Konzentration	70
4.3.	<u>DDC-Wirkungen</u>	71
4.3.1.	Versuche zur semikonservativen DNA-Synthese (SDS)	71
4.3.1.1.	In vitro-Wirkung von DDC auf den semikonservativen ^3H -dT-Einbau	71

4.3.1.2.	In vivo-Wirkung von DDC auf den semikonservativen ^3H -dT-Einbau in vitro	75
4.3.1.2.1.	^3H -dT-Einbau in Abhängigkeit von der DDC-Dosis	75
4.3.1.2.2.	^3H -dT-Einbau in Abhängigkeit von der Überlebenszeit nach DDC-Applikation	77
4.3.1.3.	In vivo-Markierung der DNA mit ^3H -dT	79
4.3.2.	Gewichte von Thymus und Milz nach DDC-Applikation	81
4.3.3.	Versuche zur unprogrammierten DNA-Synthese (UDS)	83
4.3.3.1.	In vitro-Wirkung von DDC auf den unprogrammierten ^3H -dT-Einbau	83
4.3.3.2.	In vivo-Wirkung von DDC auf den unprogrammierten ^3H -dT-Einbau in vitro	89
4.3.3.2.1.	^3H -dT-Einbau in Abhängigkeit von der DDC-Dosis	89
4.3.3.2.2.	^3H -dT-Einbau in Abhängigkeit von der Überlebenszeit nach DDC-Applikation	91
4.3.4.	Vergleich der ^3H -dT-Einbauraten von Knochenmarks- und Thymuszellen	94
4.3.5.	Versuche zur RNA-Synthese	96
4.3.6.	Isotopenverdünnungsanalysen	97
4.3.6.1.	In vitro-Wirkung von DDC auf den endogenen Thymidinpool	97
4.3.6.2.	In vivo-Wirkung von DDC auf den endogenen Thymidinpool	99
4.3.7.	Nucleoidsedimentation	101
4.3.7.1.	In vivo-Wirkung von DDC auf die Nucleoidsedimentation	101
4.3.7.2.	In vivo-Wirkung von DDC auf die Nucleoidsedimentation nach Ganzkörperstrahlung	102
4.3.8.	Intrazelluläre ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metabolitenkonzentration und ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metaboliten-Rücktransport	103
4.3.8.1.	Unprogrammierte DNA-Synthese	103
4.3.8.2.	Semikonservative DNA-Synthese	106

4.3.9.	Phosphorylierungsmuster des intrazellulären ^3H -dT	110
5.	DISKUSSION	112
5.1.	<u>Hydroxyharnstoff (HU) und Reparatursynthese (UDS)</u>	112
5.2.	<u>UV-Bestrahlung</u>	114
5.3.	<u>DDC-Wirkungen</u>	116
5.3.1.	SDS und UDS	116
5.3.2.	Bestrahlung	122
5.3.3.	Intrazelluläre ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metabolitenkonzentration, ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metaboliten-Rücktransport, Phosphorylierungsmuster	124
5.3.4.	RNA-Synthese	126
5.3.5.	Endogener Thymidinpool	127
5.4.	<u>Schlußfolgerung und Ausblick</u>	128
6.	ZUSAMMENFASSUNG	133
	SUMMARY	136
7.	LITERATURVERZEICHNIS	139
	Lebenslauf	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATP	-	Adenosintriphosphat
cpm	-	Impulse/min
d...	-	"desoxy"...
DABA	-	3,5-Diamino-Benzoesäure
DDC	-	Diäthylthiocarbamat
DNA	-	Desoxyribonucleinsäure
dpm	-	Zerfälle/min
GDP	-	Guanosindiphosphat
GTP	-	Guanosintriphosphat
HPLC	-	High Pressure Liquid Chromatography
HU	-	Hydroxyharnstoff
i.p.	-	intraperitoneal
KG	-	Körpergewicht
NTP	-	Nucleosidtriphosphat
RNA	-	Ribonucleinsäure
RNR	-	Ribonucleotid-Reduktase
SDS	-	semikonservative DNA-Synthese
SOD	-	Superoxiddismutase
T	-	Thymin
TDP	-	Thymidindiphosphat
TMP	-	Thyminmonophosphat
TTP	-	Thymintriphosphat
U	-	Uridin
UDS	-	unprogrammierte DNA-Synthese
UV	-	Ultraviolettlicht bzw. -bestrahlung

1. PROBLEMSTELLUNG

Diäthylthiocarbamat (DDC) hat aufgrund seiner intensiven und vielfältigen Reaktionsbereitschaft das Interesse verschiedener naturwissenschaftlicher Disziplinen geweckt. Während frühere Untersuchungen insbesondere der komplexbildenden Fähigkeit des DDC gegenüber Metallionen gewidmet waren und unter pharmakologisch-toxikologischen Gesichtspunkten durchgeführt wurden, richtet sich die Aufmerksamkeit der medizinischen Forschung in letzter Zeit zunehmend auf die zelluläre Wirkung der Substanz im Zusammenhang mit Strahlenexposition und Tumorthherapie.

Anknüpfend an frühere *in vitro*-Analysen an Thymus- und Milzzellen der Ratte, sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, mögliche Wirkungen von DDC auf die DNA und den DNA-Stoffwechsel an der gleichen Species *in vivo* nachzuweisen. Dabei ergaben sich insbesondere folgende Fragestellungen:

1. Wie wirkt sich die *in vivo*-Applikation von DDC auf zelluläre DNA-Synthese und DNA-Reparatur aus?
2. Bestehen Unterschiede zwischen verschiedenen Zellsystemen - hier Knochenmark und Thymus - hinsichtlich der DDC-Wirkung?
3. Greift DDC direkt in die DNA-Synthese und DNA-Reparaturprozesse ein oder werden primär DNA-Vorstufen und Energiestoffwechsel der Zelle beeinflusst?

4. Sind Unterschiede in der in vitro- und in vivo-Wirkungsweise von DDC zu erkennen?

Ihrem Schwerpunkt nach stützten sich die Untersuchungen auf den Einbau und die Verteilung der mit Tritium markierten DNA-Vorstufe Thymidin. Zur Auslösung von DNA-Reparatur diente Bestrahlung mit UV-Licht oder Röntgenstrahlen. Aussagen über die superhelikale DNA-Struktur wurden mit Hilfe der Nucleoidsedimentation gewonnen.

2. EINLEITUNG

Um ein besseres Verständnis der vorliegenden Arbeit zu gewährleisten, erfolgt zunächst ein kurzer Abriss der DNA-Replikation und der bisher bekannten DNA-Reparaturprozesse. Eine anschließende zusammenfassende Darstellung der DDC-Funktionen versucht, einen Überblick über die vielfältigen Wirkungsweisen der Substanz zu geben.

2.1. DNA-Synthese

(Übersichten siehe unter Ziffer 2,48,53,54,74 des Literaturverzeichnis)

Die genetische Information des Organismus ist in der DNA als Sequenz der Basen gespeichert. Ein DNA-Molekül setzt sich aus zwei Nucleinsäuremolekülen zusammen, die in Form einer Doppelhelix schraubenartig ineinander verwunden sind. Die Basen sind in das Innere der Helix gerichtet und über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden. Dabei paart sich immer Adenin mit Thymin und Guanin mit Cytosin. Die negativ geladenen Phosphatbrücken, die die einzelnen Desoxyribonucleotide verbinden, zeigen nach außen und werden von basischen Proteinen (Histonen) neutralisiert.

Der lebende Organismus muß seine DNA vor jeder Zellteilung zur Weitergabe seiner genetischen Information identisch replizieren. Dieser Replikationsmechanismus verläuft semikonservativ, d.h. beide Stränge der ursprünglichen DNA dienen als Matrize für die Neusynthese eines DNA-Stranges, so daß in der neuen

Doppelhelix jeweils ein Einzelstrang der Elternhelix unverändert erhalten bleibt. Die Replikation startet an mehreren Initiationspunkten und verläuft jeweils bidirektional, d.h. in zwei auseinanderlaufenden Replikationsgabeln. Dadurch entstehen einzelne replizierte Schleifen, die zusammenlaufen, bis die gesamte DNA repliziert ist. Dabei werden nur kurze DNA-Stücke synthetisiert, die anschließend zu längeren Strängen verknüpft werden, d.h., die Neusynthese in der Replikationsgabel erfolgt diskontinuierlich.

Voraussetzung für die DNA-Replikation sind ein ausreichender DNA-Vorstufenpool (alle vier Desoxyriboside als Triphosphat), eine verfügbare Matrize und ein DNA-Replikasesystem, das sich aus mehreren Enzymen zusammensetzt. Zu Beginn der Replikation muß der DNA-Strang an den Initiationspunkten mit Hilfe einer Endonuclease aufgespalten werden. Anschließend wird die Doppelhelix durch ein Entwindungsprotein entspiralisiert. Vom Initiationspunkt ausgehend wird zunächst durch die RNA-Polymerase in 5'-3'-Richtung ein Stück RNA (primer) synthetisiert. An diese Starter-RNA wird dann durch die DNA-Polymerase $\downarrow$, die nur an ein Ribonucleotid-Startermolekül weitere Nucleotide anknüpfen kann, fortschreitend DNA synthetisiert. Auf diese Weise entstehen die sogenannten Okazaki-Abschnitte. Die Starter-RNA wird anschließend durch die RNAase H abgespalten; die entstandene Lücke wird mit Hilfe einer DNA-Polymerase gefüllt. Der anfangs gesetzte Strangbruch am Initiationspunkt wird durch die Polynucleotid-Ligase wieder verknüpft. Die auf diese Weise synthetisierten kurzen Stücke replizierter DNA werden durch die

DNA-Polymerase Δ verlängert. Die Verbindung der DNA-Fragmente erfolgt wiederum durch die Polynucleotid-Ligase. Schließlich ist die gesamte DNA repliziert, und das Resultat sind zwei identische Kopien der ursprünglichen Doppelhelix.

2.2. DNA-Reparatur

(Übersichten siehe unter Ziffer 6,12,36,46,48,51,53,59 des Literaturverzeichnisses)

Die Zellen eines jeden lebenden Organismus sind einer Vielzahl von schädlichen Umwelteinflüssen ausgesetzt. So können z.B. ionisierende Strahlen, UV-Licht, Viren und chemische Substanzen die im Grunde recht labile DNA der Zellkerne mutativ verändern.

Tab.1 gibt einen Überblick über mögliche Schadformen der DNA.

1. <u>Basenschäden</u>	
Dimere vom Cyclobutantyp	UV-Strahlen
Addukte	UV-Strahlen
Hydrate	UV-Strahlen
Alkylierung	alkylierende Substanzen
Depurinierung	alkylierende Substanzen, spontane Hydrolyse
2. <u>Strangbrüche</u>	
Einzelstrangbrüche	ionisierende Strahlen
Doppelstrangbrüche	ionisierende Strahlen
3. <u>Crosslinks</u>	
Verknüpfungen zwischen Nucleinsäuren (intrastrand crosslinks)	chem.Agentien, z.B. Mitomycin C
Verknüpfungen zwischen Nucleinsäuren und Protein (interstrand crosslinks)	chem.Agentien, UV-Strahlen
4. <u>Interkalation</u>	z.B. Ethidiumbromid

Tab.1: Beispiele für Schädigungen der DNA

Gegen Schädigungen der genannten Art vermag sich die Zelle in beschränktem Umfang durch endogene Reparaturmechanismen zu schützen. Die DNA-Reparatur dient somit prinzipiell der genetischen Integrität der Art und schützt auch die nicht germinativen Zellen weitgehend vor somatischen Mutationen, die zu den cancerogenen Basismechanismen gehören. Bleibt die Reparatur

der geschädigten DNA aus, kann die somatische Mutation zur Malignisierung führen. Wird dagegen der mutative Schaden vor der Teilung beseitigt, so ist es den Reparaturmechanismen zu verdanken, daß somatische Mutationen wirkungslos bleiben. Im folgenden soll ein kurzer Überblick über bisher untersuchte Reparaturprozesse dargestellt werden. Der Excisionsreparatur, die die typische Antwort der Zelle auf die im Rahmen dieser Arbeit gesetzte Schädigung der DNA durch UV-Licht und ionisierende Strahlen darstellt, wird dabei besondere Aufmerksamkeit gewidmet.

PRÄREPLIKATIVE REPARATUR
1. <u>Photoreaktivierung</u>
2. <u>Dunkelreparatur</u>
2.1. Strangbruchreparatur
2.2. Basenexcision
2.3. Nucleotidexcision
-Kurzkettenexcision (etwa 30 bis 100 Nucleotide)
- ionisierende Strahlen
-Langkettenexcision (etwa 1500 Nucleotide)
- UV-Licht
2.4. Dealkylierung von DNA-Basen (z.B. O ⁶ -Methylguanin)
POSTREPLIKATIVE REPARATUR
1. <u>Rekombinationsreparatur</u>
2. <u>SOS-Reparatur</u>
3. <u>Plasmidkontrollierte Reparatur</u>

Tab.2: DNA-Reparaturformen

2.2.1. Präreplikative Reparatur

2.2.1.1. Photoreaktivierung

Die Photoreaktivierung stellt wohl die einfachste Form der Reparaturprozesse dar. In Gegenwart von sichtbarem Licht werden hierbei die durch UV-Einwirkung entstandenen Pyrimidindimere mit Hilfe einer Photolase in Monomere zerlegt.

2.2.1.2. Strangbruchreparatur

Strangbrüche des DNA-Moleküles sind vorwiegend durch ionisierende Strahlen bedingt und können durch Trennung der Phosphatdiesterbindung, durch Auflösung einer C-C-Bindung im Zucker und durch Sprengung der Sauerstoffbrücke im Zucker auftreten. Die Reparatur dieser DNA-Schäden erfolgt wahrscheinlich auf ähnliche Weise wie die Excisionsreparatur (siehe unten). Die geschädigten DNA-Stellen werden durch Exonucleasen eliminiert; Polymerasen synthetisieren ein neues Strangstück, und Ligasen stellen die Verbindung mit dem intakten Reststrang wieder her.

2.2.1.3. Basenexcision

DNA-Glycosylasen, die auf bestimmte Basen spezialisiert sind, vermögen geschädigte Basen durch Hydrolyse der N-glycosidischen Bindung vom DNA-Strang zu trennen, ohne das Zucker-Phosphat-Gerüst anzugreifen. Die entstandene Lücke wird wahrscheinlich durch eine Insertase wieder aufgefüllt.

2.2.1.4. Nucleotidexcision

Bei der Nucleotidexcision, der wohl wichtigsten Reparaturform, wird nicht nur die geschädigte Base entfernt, sondern mit der alterierten Base ein kurzer oder längerer Strang benachbarter Nucleotide herausgeschnitten. Man unterscheidet eine fehlerfrei arbeitende Kurzstrangexcision und eine mit Fehlern behaftete Langstrangexcision.

2.2.1.4.1. Kurzstrangexcision

Die Kurzstrangexcision wird vorwiegend nach Einwirkung von ionisierenden Strahlen beobachtet. Dieser Reparaturprozeß läuft durch ein Zusammenwirken verschiedener Reparaturenzyme ab. Zunächst erfolgt eine Incision in der Nähe der geschädigten Stelle. Dieser Prozeß wird durch Endonucleasen katalysiert, welche die Phosphordiesterbrücke an der 5'-Glycosylbindung hydrolysieren und auf ein breites Spektrum verschiedener Strahlenschäden reagieren. Darüberhinaus existieren Endonucleasen, die auf einen Basenverlust hin einen Strangbruch herbeiführen, sogenannte AP-Endonucleasen (AP = "apurinic site" oder "apyrimidinic site") und dadurch statt einer einfachen Basenexcision eine Nucleotidexcision hervorrufen. Vorausgegangen ist hierbei eine DNA-Glycosylase-vermittelte Basenexcision. Durch die Aktivität der Endonucleasen ist ein freies Strangende entstanden, das den Ansatzpunkt für Exonucleasen bildet, die daraufhin ein DNA-Strangstück einschließlich der geschädigten Stelle herauszuschneiden. Der intakte Komplementärstrang dient Polymerasen als Matrize

für die Neusynthese des herausgeschnittenen Abschnittes der DNA. Ligasen beenden den Reparaturvorgang, indem sie die neu-synthetisierten Kettenstücke einfügen und deren Enden mit den intakten Abschnitten des DNA-Stranges verbinden. Dieser Reparaturmechanismus arbeitet außerordentlich rasch (min) und aufgrund ständiger Korrektur möglicher Fehleinbauten über die Exonucleasentätigkeit, die auch gleichzeitig von den Polymerasen wahrgenommen werden kann, mit großer Exaktheit.

2.2.1.4.2. Langkettenexcision

Die Langkettenexcision, die z.B. durch UV-Licht induziert wird, arbeitet im Gegensatz zur Kurzkettenreparatur nicht fehlerfrei. Es wird vermutet, daß eine Langkettenexcision dann abläuft, wenn beide DNA-Stränge relativ nahe beieinander geschädigt wurden. Im Prinzip verläuft diese Reparaturform wie die o.g. Kurzkettenexcision, jedoch werden wesentlich längere DNA-Abschnitte herausgeschnitten. Auch die Beteiligung unterschiedlicher Polymerasen an den beiden Reparaturformen wird diskutiert. Fehler können dann auftreten, wenn Abbau und Polymerisation des einen Stranges die Schadstelle des zweiten Stranges überschreiten. Da an dieser Stelle kein intakter DNA-Abschnitt mit Matrizenfunktion für die entsprechende Neusynthese des gegenüberliegenden Stranges vorhanden ist, kann es zum Einbau falscher Nucleotide kommen.

2.2.1.5. Dealkylierung von DNA-Basen (z.B. O⁶-Methylguanin)

Ein zunächst nur für E.coli, mittlerweile auch an Säugetierzellen nachgewiesener Reparaturmechanismus besteht in der Demethylierung von O⁶-Methylguanin. Dieser Reparaturvorgang, der ganz entscheidend zur Senkung der Mutationsrate beiträgt, wird durch eine Methyltransferase katalysiert.

2.2.2. Postreplikative Reparatur

DNA-Schäden, die nicht zeitgerecht zur DNA-Replikation repariert werden, führen einerseits zum Abbruch der Replikation und somit zu einem genetischen Informationsverlust der Zelle. Andererseits kann jedoch die DNA-Polymerase über die geschädigte Stelle hinweggehen und die Neusynthese des Tochterstranges hinter der Schadstelle wieder aufnehmen. Dadurch entstehen postreplikative Lücken im Tochterstrang, für die die Zelle wiederum spezifische Reparaturprozesse entwickelt hat. Die verbliebenen Lücken gegenüber den geschädigten Einzelsträngen werden durch Transfer von korrespondierenden Strangabschnitten des anderen Tochtermoleküles der gleichen Replikationsgabel aufgefüllt. Die dadurch in den Tochtermolekülen entstandenen Stranglücken können jetzt durch Neusynthese, indem der intakte Komplementärstrang als Matrize dient, wieder gefüllt werden. Eine Ligase stellt die Integrität der DNA her. Noch verbleibende Schäden in den Tochtersträngen können entweder durch mehrere Replikationsrunden oder durch anschließende Excisionsreparatur beseitigt werden. Für diese Form der DNA-Reparatur

sind neben Endonucleasen und Polymerasen noch Enzyme für den Rekombinationsprozeß beteiligt, die bisher noch nicht alle bekannt sind, deren Gene jedoch durch genetische Analysen z.T. nachgewiesen wurden.

2.2.2.1. SOS-Reparatur

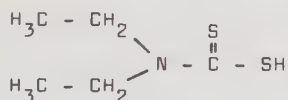
Eine weitere Möglichkeit der postreplikativen DNA-Reparatur ist durch die sogenannte SOS-Reparatur gegeben. Im Unterschied zur Rekombinationsreparatur werden nach der DNA-Replikation auftretende Stranglücken nicht durch Austausch von Strangstücken, sondern durch Neusynthese der fehlenden Teilstränge beseitigt. Der exakte Ablauf dieses Reparaturmechanismus ist bisher noch hypothetisch, wenngleich bei Bakterien zwei Gene und ihre Genprodukte - Rec A-Protein und Lex A-Protein - identifiziert werden konnten, die für die Durchführung dieser Reparatur eine entscheidende Rolle spielen.

2.2.2.2. Plasmidkontrollierte Reparatur

Eine Reparaturform, die nur in Bakterien vorkommt, stellt die plasmidkontrollierte DNA-Reparatur dar; ihr Wirkungsmechanismus ist noch weitgehend unbekannt. Plasmide - zusätzliche DNA-Moleküle, die nicht im Bakterienchromosom lokalisiert sind - sind hierbei für die Reparatur von UV-induzierten DNA-Schäden verantwortlich.

2.3. Diäthylthiocarbamat (DDC)

DDC ist eine niedermolekulare Substanz, deren funktionelle Wirkungseinheit durch eine Thiocarbamatgruppierung charakterisiert ist:



Aufgrund seiner molekularen Struktur sind zwei grundsätzliche Reaktionsmechanismen gegeben:

1. Komplexbildung mit hoher Affinität zu zweiwertig positiven Metallionen und damit auch Entfernung von Metallen aus den reaktiven Zentren von Metallenzymen,
2. Wechselwirkung mit Sulfhydryl- und Aminogruppen zellulärer Strukturen.

Diese Eigenschaften befähigen DDC, mit einer Vielzahl von körpereigenen und -fremden Substanzen in Wechselwirkung zu treten und somit auch direkt oder indirekt das zelluläre Stoffwechselgeschehen zu beeinflussen.

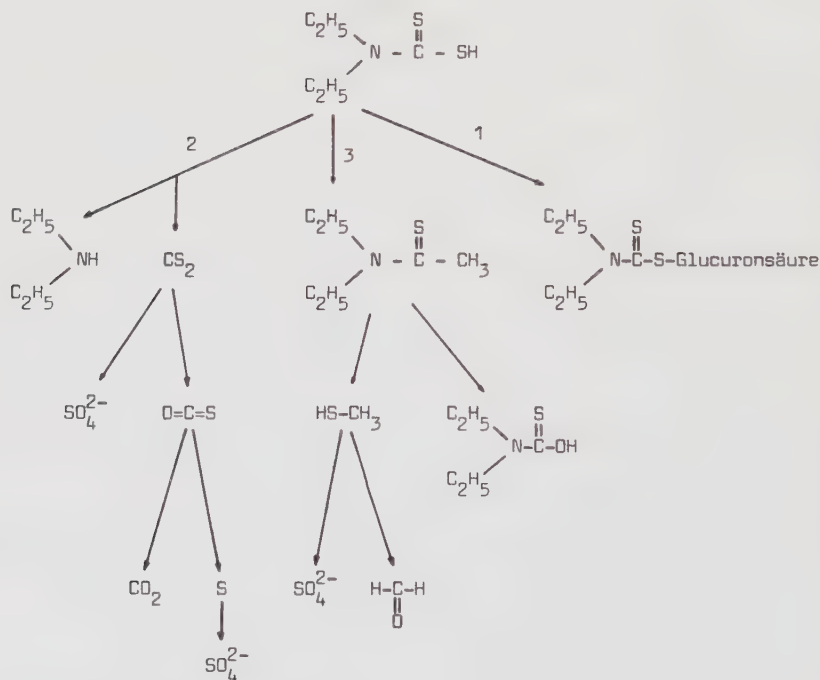
Im folgenden soll beispielhaft ein kurzer Überblick über bisher untersuchte Wirkungen von DDC gegeben werden.

2.3.1. Pharmakokinetik

Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften gelangt DDC sehr schnell ins Plasma, wird dort unter Erhaltung seiner prosthetischen Gruppe an Plasmaproteine gebunden und ebenso rasch in-

trazellulär aufgenommen (83). Bereits eine Stunde nach intra-
peritonealer Applikation werden bei der Ratte hohe Organkon-
zentrationen erreicht (28).

Die Hauptmetabolisierungsschritte von DDC sind dem folgenden
Schema zu entnehmen (28,83):



1. Die Konjugation mit der Glucuronsäure und nachfolgende Ausscheidung im Urin stellt den wichtigsten Entgiftungsmechanismus dar.
2. Nichtenzymatische Zerlegung in Diäthylamin und CS_2 mit Exkretion von CS_2 über die Lunge.
3. Methylierung zum Methylester.

Weitere wichtige Metaboliten stellen Methylmercaptan, Formaldehyd und oxidativ gebildetes anorganisches Sulfat dar.

2.3.2. Alkoholismustherapie

Disulfiram (Antabus^R), die oxidierte Disulfidform von DDC, wird in der Humanmedizin zur sogenannten "abhorrierenden" Therapie des Alkoholismus eingesetzt (32). Über eine Hemmung der Zn^{++} -haltigen Aldehyddehydrogenase (21), für die DDC, das erste Produkt der Biotransformation von Disulfiram, verantwortlich ist, wird die Metabolisierung des Alkohols verhindert. Folglich werden das Unverträglichkeitssyndrom (Kopfschmerz, Unwohlsein, Herzklopfen, Atemsteigerung) aufrechterhalten und somit eine Aversion gegenüber Alkoholgenuß erzeugt.

2.3.3. Neurotransmitter

Über eine Hemmung der Dopamin- β -Hydroxylase (42) - ein Cu^{++} -haltiges Enzym, das Dopamin zu Noradrenalin hydroxyliert - kann DDC in den Metabolismus der Katecholamine eingreifen. Dies führte dazu, daß DDC auch in der psychopharmakologischen Forschung eingesetzt wurde. So löste DDC bei Ratten eine re-

trograde Amnesie aus, die von einem erniedrigten Noradrenalin-spiegel während der Amnesie begleitet wurde (92). Ebenso konnten Schlafzyklus und Schlafphasen in Tierversuchen durch DDC-Applikation beeinflußt werden (98). Dabei zeigten alle Ratten in den Wachphasen einen epileptischen EEG-Verlauf und einen signifikanten Abfall des Noradrenalin-spiegels.

Da auch Streßsituationen mit einer erhöhten Dopamin- β -Hydroxylase-Aktivität einhergehen, könnte DDC dazu beitragen, die Streßfolgen abzuschwächen (83). Bei Ratten ließ sich das Auftreten streßbedingter Magengeschwüre durch DDC unterdrücken (47).

2.3.4. Immunologie

In die immunologischen Vorgänge des Organismus greift DDC, ohne selbst antigene oder mitogene Eigenschaften zu besitzen, v.a. durch seinen Einfluß auf die T-Lymphozytenreihe ein. So soll DDC selektiv die Neubildung und Differenzierung von Prothymozyten im Knochenmark durch Freisetzung eines Serumsfaktors induzieren und auch bereits differenzierte T-Zellen aktivieren (84). Jedoch konnte das Auftreten dieses Serumsfaktors von anderen Autoren nicht bestätigt werden (76). "Natural-Killer-Cells" - nicht näher identifizierte lymphozytenähnliche Zellen, die der T-Zelllinie zugeordnet werden, und die auch ohne vorherige Immunisation bei Virusinfektionen und v.a. zur Krebsabwehr tätig werden - zeigen unter DDC-Einfluß eine altersabhängig erhöhte Aktivität, ohne daß hierbei der endogene Interferonspiegel erhöht wird (83). Auch das immunologische Gedächtnis kann durch DDC verlängert werden. Mäuse, die zur Zeit der

Immunisierung mit DDC behandelt worden waren, besaßen nach einem Monat eine größere Anzahl spezifisch sensibilisierter T-Lymphozyten als Kontrolltiere. Darüberhinaus kann DDC eine verstärkte Freisetzung von Antikörpern des Typs IgG aus B-Lymphozyten bewirken. Auch eine reduzierte Immunsuppression, die durch verschiedene chemotherapeutisch eingesetzte Anticancerogene (z.B. Azathioprin, Cortison) bedingt ist, kann durch gleichzeitige DDC-Applikation erreicht werden (83). Untersuchungen zur mitogen-induzierten Lymphozytenproliferation führten zu unterschiedlichen in vitro- und in vivo-Ergebnissen. In vitro zeigte DDC hemmende Effekte (77), dagegen trat bei Meerschweinchen in vivo nach einer Verzögerungsperiode von etwa 10 Tagen eine deutliche Stimulierung der mitogen-induzierten Proliferation von Lymphozyten auf. Die spontane DNA-Synthese gegenüber den Kontrolltieren blieb jedoch zurück (76).

2.3.5. Anticancerogene Effekte

Neuere Untersuchungen richten sich zunehmend auf den additiven Einsatz von DDC in der Tumorthherapie. So konnten LIN et al. bei tumortragenden Zellen des Chinesischen Hamsters durch DDC-Behandlung die Wirkung des Zytostatikums Bleomycin beeinflussen. Bleomycin zeigte hierbei eine erhöhte dosis- und zeitabhängige Zelltoxizität (64). Nitrosamine (z.B. Diäthyl- oder Dimethylnitrosamin), die u.a. durch Alkylierung der DNA und RNA zytotoxische und cancerogene Eigenschaften besitzen, können durch DDC in ihrer Wirkung abgeschwächt werden. Einerseits kann dabei

die Alkylierung der Nucleinsäuren verzögert werden (117), zum anderen verhindert eine Nachbehandlung mit DDC die Entstehung von Nitrosamin-induzierten Leberzellnekrosen, die an frühen Schritten der Carcinogenese partizipieren (116) (Hemmung der postnekrotischen regenerativen Leberzellproliferation).

Darüberhinaus wird DDC eine Reihe weiterer anticancerogener Eigenschaften, wie Hemmung der Tumorinduktion durch Benzpyrene (44) oder Verminderung der spontanen Tumorentstehung in verschiedenen Organen von Ratten und Mäusen (75) zugesprochen.

2.3.6. Zytoprotektive Effekte

Versuche an Ratten zeigten, daß DDC die Nephrotoxizität von cis-Platin, einer Substanz, die zur Chemotherapie verschiedener Neoplasmen eingesetzt wird, erheblich reduzieren kann (24). Die Nephrotoxizität, die sowohl strukturelle Veränderungen als auch funktionelle Störungen der Niere umfaßt, war der bisher dosislimitierende Faktor in der Anwendung von cis-Platin. DDC verhindert die akuten Strukturschäden der Niere und schwächt die renale Dysfunktion ab, ohne die antineoplastischen Effekte von cis-Platin zu beeinträchtigen. Auch die bei cis-Platin-Applikation auftretende Diarrhoe konnte bei gleichzeitiger DDC-Verabreichung nicht beobachtet werden. KHANDEKAR, der zu gleichen Ergebnissen kam, konnte durch DDC-Gabe die LD₅₀ von cis-Platin um den Faktor 1,3 erhöhen (56). Der toxisitätsmindernde Einfluß von DDC zeigte sich - zusammen mit einer erhöhten Reparatur des cis-Platin-Schadens - auch in vitro (27). Ebenso besitzt DDC protektive Ef-

fekte gegenüber anderen leber- und nierentoxischen Substanzen (z.B. 1,1-Dichloräthylen). Als Mechanismus wird die Hemmung ihrer Metabolisierung durch das mikrosomale Monooxygenasensystem diskutiert, wobei sich v.a. CS_2 , ein Metabolit von DDC, als protektiv erweist (66).

2.3.7. Hyperthermie

Durch DDC werden die zellulären Wirkungen von Hyperthermie verstärkt, wie Untersuchungen an menschlichen und tierischen Zellkulturen ergaben (25,62). Nichttoxische DDC-Konzentrationen (10^{-3} bis 10^{-5} mol/l) verhinderten jegliche Reparatur der potentiell tödlichen Hitzeeinwirkung (43 °C) und bewirkten darüberhinaus einen vermehrten Zelluntergang. Durch die Wirkung des DDC konnte bei 42 °C der gleiche Effekt erzielt werden wie bei alleiniger Hyperthermiebehandlung bei 43 °C.

2.3.8. Superoxiddismutase (SOD)

DDC hemmt die Wirkung der SOD in vivo und in vitro (49) durch Komplexierung des Cu^{++} -Ions (15,71). Da die Hemmung dieses Enzyms eine bedeutende Rolle im physiologischen Stoffwechselgeschehen der Zelle spielen kann, soll hier etwas näher auf die Funktion des Enzyms eingegangen werden (Übersicht z.B. bei NOHL (78)). Die SOD ist ein wichtiger biologischer Faktor im Abwehrmechanismus der Zelle gegenüber endogen gebildeten Superoxidradikalen, indem sie folgende Reaktion katalysiert:



In Säugetierzellen findet man zwei Formen der SOD: Eine Cu-Zn-haltige, die sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien lokalisiert ist, und eine Fe-Mn-haltige SOD, die ausschließlich mitochondrial auftritt. Die Hemmwirkung von DDC auf die Fe-Mn-SOD konnte bisher nur in vitro nachgewiesen werden (85). Mitochondrien sind Hauptbildungsorte für zelluläre O_2^- -Konzentrationen bei normalen Stoffwechselvorgängen, da beim Elektronentransfer der Atmungskette e^- abgezweigt werden können und auf molekularen Sauerstoff übertragen werden (78). Daneben entstehen Superoxidradikale bei verschiedenen enzymatischen Aktivitäten ebenso wie durch Einwirkung ionisierender Strahlen. Durch eine Zunahme der Superoxidradikale werden metabolische Vorgänge gehemmt (Denaturierung von Enzymen und Proteinen) und biologische Membranen oxidativ zerstört (20).

In den in vitro-Analysen von RIGAS et al. zur Strahlensensibilisierung unter DDC-Einfluß wird dargelegt, daß eine Hemmung der SOD erst mit der zweiten Phase der biphasischen Radiosensibilisierung einhergeht (86). Die Vorstellung, daß zur SOD-Hemmung höhere DDC-Konzentrationen erforderlich sind, unterstützen in vivo-Untersuchungen der DDC-Effekte auf die Sauerstofftoxizität an Ratten (19). Hierbei weisen niedrige DDC-Konzentrationen keinen Einfluß auf die O_2 -Toxizität auf, mittlere Dosen bedingen sogar über eine Erhöhung der Glutathion-Enzymaktivitäten protektive Effekte, während erst bei gesteigerten DDC-Dosen durch Hemmung der SOD eine erhöhte Letalität durch Hyperoxie eintritt. Eine mögliche Erklärung gibt MISRA, indem er nachweist, daß die Reaktion eines DDC-Moleküles mit dem Cu(II) der SOD zur Bildung

eines Cu(II)-DDC-Komplexes führt, der an das Enzym unter Erhaltung seiner Aktivität gebunden bleibt. Erst ein zweites DDC-Molekül entfernt über Bildung eines Cu(II)-(DDC)₂-Komplexes das Kupferion, woraus der Verlust der katalytischen Aktivität der SOD resultiert (71). Dieser Annahme widersprechen jedoch Untersuchungen, die die Inhibierung der SOD-Aktivität in strikter Parallelität mit der Bindung schon eines DDC-Moleküles sehen (15).

2.3.9. Mikrosomale Mischoxidasen

DDC hemmt die Aktivität der Cytochrom P-450 enthaltenden Monooxygenasen (68), - Enzymkomplexe, die aus Lebermikrosomen isoliert wurden und wichtige Katalysatoren für die Biotransformation körperfremder niedermolekularer Substanzen sind. Durch mikrosomale Oxidation von DDC und seinen Metaboliten Diäthylamin und CS₂ entsteht atomarer Schwefel, der kovalent an Cysteinyreste des Cytochrom P-450 gebunden wird und somit die Hemmung der mikrosomalen Mischoxidasen bewirkt (97). GRAFSTRÖM und GREENE führten die DDC-vermittelte Hemmung der Metabolisierung von Procarcinogenen, z.B. Benzpyren, und die daraus resultierende Herabsetzung von Benzpyren-induzierter Darm- und Lebercarcinogenese ebenfalls auf eine verminderte Monooxygenasenaktivität zurück (44).

Hinsichtlich der δ -Aminolaevulinat-Synthase und der mikrosomalen Hämoxygenase - Enzyme, die an der Synthese und am Abbau des Häms beteiligt sind - zeigte DDC induktive Effekte (68,97).

2.3.10. Glutathionperoxidase und Katalase

Glutathionperoxidase und Katalase - Enzyme, die für die Elimination von H_2O_2 verantwortlich sind - werden durch DDC unterschiedlich beeinflusst. Während die Aktivität der Glutathionperoxidase nach DDC-Applikation gehemmt wird (19,41), bleibt die Katalaseaktivität unbeeinträchtigt (39,49).

2.3.11. Cytochromoxidase

Die kupferhaltige Cytochromoxidase, ein komplexes Hämoprotein, das für den Elektronentransfer in der Atmungskette verantwortlich ist, wird durch DDC inaktiviert (35).

2.3.12. Metallkomplexierung

Aufgrund der bereits erwähnten Fähigkeit von DDC, zweiwertig positive Metallionen zu komplexieren, ergibt sich die Möglichkeit einerseits zur kompleximetrischen Bestimmung verschiedener Metalle, andererseits zum therapeutischen Einsatz der Substanz. GALE et al. konnten in vitro die Reaktion von DDC mit 12 verschiedenen Metallionen (Ag^{++} , Cd^{++} , Co^{++} , Cu^{++} , Fe^{++} , Fe^{+++} , Hg^{++} , Mn^{++} , Ni^{++} , Pb^{++} , Sn^{++} , Zn^{++}), nicht jedoch mit Ca^{++} und Mg^{++} nachweisen (37). Obgleich DDC Fe^{++} und Fe^{+++} in vitro komplexiert, konnte es nicht mit den Eisenionen des Hämoglobins in intakten Erythrozyten reagieren. Somit bleibt die Wirkung auf Eisenionen widersprüchlich, zumal LIN et al. auch in vitro keine Chelatbildung mit Fe^{++} konstatieren (64).

Bei Cadmiumvergiftungen stellt DDC ein wirksames Antidot dar, seine prophylaktische Verabreichung zeigt jedoch eine geringere Wirkung (38).

SUNDERMANN konnte DDC erfolgreich zur Behandlung der akuten Nickelvergiftung und Nickeldermatitis einsetzen (96). DDC bildet mit Nickel einen stabilen Komplex und erhöht darüberhinaus die Elimination dieses Metalles über die Nieren sowie seine Mobilisation aus Leber und Blut.

2.3.13. Strahlenexposition

Hinsichtlich seines Effektes im Zusammenhang mit Strahlenexposition werden DDC in vitro unterschiedliche Eigenschaften zugesprochen. RIGAS et al. fanden bei menschlichen Lymphozyten unter DDC-Einfluß eine biphasische Strahlensensibilisierung, wobei die erste Phase durch Zn^{++} und die zweite Phase, die im Gegensatz zur ersten mit einer Abnahme der SOD-Aktivität einhergeht, durch Cu^{++} aufgehoben werden konnten (86). Parallel zu dieser strahlensensibilisierenden DDC-Wirkung stellte die gleiche Arbeitsgruppe bei T-Lymphozyten und polymorphkernigen Granulozyten einen konzentrationsabhängig biphasischen toxischen DDC-Effekt *in vitro* fest (85). Auch hierbei waren die beiden Phasen durch $ZnCl_2$ bzw. $CuCl_2$ aufhebbar. Auch WESTMANN und MIDANDER gelangten anhand der Überlebensrate von Zellen des Chinesischen Hamsters zu einer biphasischen DDC-Konzentrations-Wirkungskurve (110). LIN et al. zeigten, daß DDC-behandelte Zellen durch ionisierende Strahlen stärker geschädigt wurden als

die Kontrollen (63). Gleichzeitige Hemmung der SOD-Aktivität, elektronenmikroskopisch veränderte Mitochondrienmatrix und das Auftreten von Myelinstrukturen in den Mitochondrienmembranen ließen die Autoren auf eine Beteiligung von $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen an diesen Schäden schließen. An der gleichen Zellart bestätigten WESTMANN und MARKLUND die strahlensensibilisierende Wirkung von DDC bei in vitro-Versuchen (111). Die beobachteten Effekte waren hier jedoch nicht so stark ausgeprägt wie in den Versuchen von LIN et al., obgleich eine 30fach höhere DDC-Konzentration eingesetzt wurde und die SOD-Hemmung 95 % gegenüber 30 % bei LIN et al. betrug. STONE et al. stellten eine Erhöhung der Radiosensitivität von Erythrozyten nach DDC-Verabreichung fest und führten dies gleichfalls auf Hemmung der SOD zurück (94). Neben einer herabgesetzten SOD-Aktivität, die zu einem erhöhten, durch radiolytische Reaktion gebildeten $O_2^{\cdot-}$ -Gehalt der Zellen führt, wird auch eine Hemmung der Cytochromoxidase für diese Effekte verantwortlich gemacht (63). Die verminderte Aktivität dieses Enzymes stellt eine additive Wirkung zur SOD-Hemmung dar, da die Cytochromoxidase als $O_2^{\cdot-}$ -Fänger für die durch das mitochondriale Elektronentransfer-System gebildeten Superoxidradikale agieren kann. Somit wäre die herabgesetzte Radioresistenz in erster Linie auf einen erhöhten $O_2^{\cdot-}$ -Radikalgehalt der Zellen zurückzuführen.

Konträr zu den oben angeführten Befunden sprechen EVANS et al. DDC einen radioprotektiven in vitro-Effekt bei gleichzeitiger SOD-Hemmung zu, der zudem von einer geringgradig erhöhten Repa-

ratur des Strahlenschadens nach Exposition begleitet wird (27). Auch BARTOSZ und LEYKO wiesen einen radioprotektiven in vitro-Effekt von DDC auf Erythrozyten nach (8). Außerdem konnten diese Autoren auch keinen spezifischen Strahlenschutzeffekt der SOD feststellen.

Im Gegensatz zur Mehrzahl der in vitro-Studien besitzt DDC in vivo radioprotektive Eigenschaften. Schon 1953 und 1956 berichteten BACQ et al. sowie VAN BEKKUM über protektive Effekte von DDC gegenüber ionisierenden Strahlen (95,104). Durch Bildung gemischter Disulfide mit biologischen Sulfhydryl- und Disulfidgruppen sollte DDC seine protektiven Eigenschaften entfalten und somit zum Schutz vieler S-haltiger Zellkomponenten beitragen. EVANS et al. konnten nach Vorbehandlung mit DDC (1000 mg/kg) die $LD_{50/30}$ bei röntgenbestrahlten Mäusen um den Faktor 1,8 steigern (26). Dieser Effekt, der bei Halbierung der DDC-Konzentration nicht auftrat, könnte nach Ansicht der Autoren v.a. auf einem Schutz der Knochenmarkszellen beruhen.

Abschließend bleibt anzumerken, daß die widersprüchlichen Ergebnisse der Wirkungsweise von DDC nach Bestrahlung in vitro nur schwer untereinander vergleichbar sind, da den Analysen unterschiedliche Versuchsbedingungen hinsichtlich DDC-Konzentration, Medium, Bestrahlungsart und -dauer zugrunde liegen.

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1. Reagentien

Aktivkohle

MERCK, Darmstadt, Nr. 2186

Ammoniaklösung, mind. 25 %



MERCK, Darmstadt, Nr. 5432

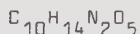
Desoxyribonucleinsäure (DNA)

Na-Salz der DNA aus Kälberthymus

MW $8,9 \times 10^6$, mind. 95 % DNA

EGA-Chemie, Steinheim, Nr. 16,820-3

2'-Desoxythymidin (dT)



SERVA, Heidelberg, Nr. 18600

3,5-Diaminobenzoesäure (DABA)



MERCK, Darmstadt, Nr. 820405

Diäthyläther



MERCK, Darmstadt, Nr. 923

Diäthylthiocarbamat-Na-Salz (DDC)



SERVA, Heidelberg, Nr. 18811

Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat



MERCK, Darmstadt, Nr. 6580

EDTA·Na₂

Äthylendiamintetraessigsäure-Na-Salz

SERVA, Heidelberg, Nr. 11280

Ethidiumbromid

2,7-Diamino-10-äthyl-9-phenylphenanthridium-bromid

SERVA, Heidelberg, Nr. 21238

D(+)-Glucose (Monohydrat)



MERCK, Darmstadt, Nr. 8342

HANKS-Lösung

(Ca⁺⁺- und Mg⁺⁺-frei)

1 l wäßrige Lösung enthält:

NaCl 136,9 mmol/l

Na₂HPO₄ 0,33 mmol/l

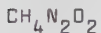
KCl 5,36 mmol/l

KH₂PO₄ 0,36 mmol/l

Glucose 5,55 mmol/l

Zu 1 l dieser Lösung werden 25 ml einer wäßrigen NaHCO₃-Lösung (167 mmol/l) gegeben und die gesamte Lösung mit HCl (1 mol/l) auf pH = 7,4 eingestellt.

Hydroxyharnstoff (HU)



SIGMA, Taufkirchen, Nr. H-8627

Kaliumchlorid

KCl

MERCK, Darmstadt, Nr. 4936

Kaliumdihydrogenphosphat



MERCK, Darmstadt, Nr. 4871

LyseLösung für die Nucleoidsedimentation

1 l wäßrige Lösung enthält:

NaCl 1,5 mol/l

EDTA·Na₂ 0,1 mol/l

Triton X-100 0,7 % (V/V)

pH-Wert-Einstellung mit NaOH (1 mol/l) auf pH = 8,0.

Methanol

CH₃OH

MERCK, Darmstadt, Nr. 6009

³H-Methylthymidin

sterile wäßrige Lösung

50 - 80 Ci/mmol (1,85 - 2,96 TBq/mmol)

NEW ENGLAND NUCLEAR, Dreieichenhain, NET-0272

³H-Methylthymidin

sterile wäßrige Lösung

6,7 Ci/mmol (0,248 TBq/mmol)

NEW ENGLAND NUCLEAR, Dreieichenhain, NET-027

Natriumchlorid

NaCl

MERCK, Darmstadt, Nr. 6404

Natriumhydrogencarbonat

NaHCO₃

MERCK, Darmstadt, Nr. 6329E

Natronlauge

NaOH

hergestellt aus Titrisol^R

400 g NaOH für 1 l Natronlauge (1 mol/l)

MERCK, Darmstadt, Nr. 9959

Perchlorsäure, 70 %

HClO₄

MERCK, Darmstadt, Nr. 519

Quickszint^R 402

Szintillator auf der Basis eines Triton X-100/Toluol-Gemisches mit PPO und POPOP zur Messung wäßriger Proben
ZINSSER, Frankfurt, Nr. 16632

Saccharose



zur Dichtegradientenzentrifugation
MERCK, Darmstadt, Nr. 7654

Salzsäure

HCl

hergestellt aus Titrisol^R

36,461 g HCl für 1 l Salzsäure (1 mol/l)

MERCK, Darmstadt, Nr. 9973

Salzsäure, rauchend 37 %

HCl

MERCK, Darmstadt, Nr. 317

Stammlösung für den Saccharosegradienten

1 l wäßrige Lösung enthält:

NaCl 1,5 mol/l

Trispuffer 0,02 mol/l

EDTA·Na₂ 1 mmol/l

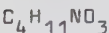
Ethidiumbromid 76,08 µmol/l

Aus dieser Lösung wird eine 15 bzw. 30 %ige (g/g)

Saccharoselösung hergestellt.

pH-Wert-Einstellung mit rauchender HCl auf pH = 8,0.

Tris(hydroxymethyl)aminomethan



Puffersubstanz

MERCK, Darmstadt, Nr. 8382

Triton X-100

nichtionisches Detergens

Octylphenol-polyäthylenglykoläther

SERVA, Heidelberg, Nr. 37240

Trypanblau

$C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$

MERCK, Darmstadt, Nr. 11732

^{14}C -Uridin

wässrige Lösung mit 2 % Äthanolzusatz

450 - 540 mCi/mmol (16,6 - 20 GBq/mmol)

AMERSHAM BUCHLER, Braunschweig, CFB.51

3.2. Tiermaterial

Als Versuchstiere dienten etwa 3 Monate alte, weibliche Wi-star-Ratten aus institutseigener konventioneller Zucht mit einem Gewicht von 180 - 220 g. Die Haltung der Tiere erfolgte in Gruppen zu 5 Ratten in Makrolonkäfigen nach FISCHER und GÖNNERT (15 x 21 x 37 cm) bei Raumtemperaturen zwischen 22 - 24 °C. Altromin^R-Fertigfutter (ALTROGGE Kraftfutter GmbH Lage, Lippe) und Trinkwasser standen ad libitum zur Verfügung.

3.3. Versuchsmethoden

Versuche zur SDS, UDS, RNA-Synthese sowie Nucleoidsedimentation und Isotopenverdünnungsanalysen wurden in Anlehnung an laborübliche Methoden durchgeführt (40,101,114). Bei den Markierungsanalysen wurden im Rahmen dieser Arbeit statt Zentrifugengläsern Reaktionsgefäße (EPPENDORF 3812) verwendet. Dadurch verringerten sich v.a. Probenvolumina und Zentrifugationszeiten, was zu erheblicher Zeitersparnis und zu einer Verringerung des radioaktiven Abfalls führte.

3.3.1. Behandlung der Tiere

3.3.1.1. Injektionen

Die DDC-Lösung wurde unmittelbar vor Injektion hergestellt. Dabei wurde die Substanz in steriler, physiologischer Kochsalzlösung gelöst und i.p. injiziert. Die Konzentration der Lösung

war so eingestellt, daß den Tieren stets ein Volumen von 0,5 ml pro 100 g KG verabreicht wurde.

Bei in vivo-Markierungen mit ^3H -dT wurde die ^3H -dT-Charge mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und in einer Dosis von 1 μCi (37 KBq) ^3H -dT pro g KG in einem Volumen von 0,5 ml pro 100 g KG gleichfalls i.p. injiziert.

Die Kontrolltiere erhielten die gleichen Mengen physiologischer Kochsalzlösung und wurden identischen Haltungs- und Aufarbeitungsbedingungen unterworfen wie die DDC-behandelten Tiere.

3.3.1.2. Ganzkörperrentgenbestrahlung

Zur Ganzkörperrentgenbestrahlung wurden die Ratten einzeln in ein oben offenes, rundes Glasgefäß mit einem Durchmesser von 20 cm verbracht und während der Bestrahlung mit einem verstell- und arretierbaren Drahtgitter in der Mitte des Glasgefäßes leicht fixiert. Die Bestrahlung erfolgte mit dem Kristalloflex 4 der Fa. SIEMENS und HALSKE (Scheitelspannung 60 kV, Röhrenstrom 30 mA, Energiedosisleistung 0,8 Gy/min, Halbwertschicht 0,16 mm Cu, Filterung mit 0,16 mm Cu, Fokus-Tier-Abstand 20 cm).

Die Kontrolltiere wurden unter den gleichen Bedingungen in die Bestrahlungskammer verbracht und einer gleichdauernden Scheinbestrahlung unterzogen.

3.3.2. Herstellen der Zellsuspensionen

In oberflächlicher Äthernarkose wurden die Tiere dekapitiert und entblutet. Zur Gewinnung der Zellsuspensionen der Organe wurde wie folgt vorgegangen:

3.3.2.1. Knochenmark

Zur Herstellung der Knochenmarkszellsuspension wurde je nach erforderlicher Zellzahl das Knochenmark eines oder beider Oberschenkelknochen und erforderlichenfalls zusätzlich das Knochenmark der Oberarmknochen verwendet. Nach Präparation aus dem Tierkörper wurde das proximale und distale Femur- bzw. Humerusende mit der Schere abgesetzt. Die Diaphyse wurde mit 5 ml Hanks-Lösung ausgewaschen (Kanüle: BRAUN-Melsungen, Sterican L, 0,9 x 38 mm) und die resultierende Suspension 90 s bei 650 x g zentrifugiert (HEKA-Tischzentrifuge, BHG, Stufe 2). Der Überstand wurde dekantiert und das zelluläre Sediment in 2,5 ml Hanks-Lösung resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension durch zweilagiges Strumpfnylon filtriert und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gehalten.

3.3.2.2. Thymus

Nach Eröffnung der Brusthöhle wurde der Thymus exstirpiert, in kalter Hanks-Lösung gewaschen und von Bindegewebsresten befreit. Das Organ wurde auf einer Petrischale in 10 ml kalter Hanks-Lösung mit der Schere weitgehend zerkleinert und in ein 30 ml Pottergefäß (BRAUN-Melsungen, 280 S) überführt. Mit Hilfe eines locker eingeschliffenen Teflonstempels (Vermeidung von Unter- oder Überdruck, keine Drehbewegungen des Stempels) wurde durch zweimaliges vorsichtiges Auf- und Abbewegen (Vermeiden von Vakuumbildung) das Gewebe weiter aufgeschlossen. Die erhaltene Zellsuspension wurde 60 s bei 650 x g zentrifugiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter 3.3.2.1. beschrieben.

Analysen, die eine Hemmung der semikonservativen DNA-Synthese erforderten, wurden von Versuchsbeginn an mit einem Hydroxymethylharnstoffzusatz von 10^{-2} mol/l zur Ca^{++} - und Mg^{++} -freien Hanks-Lösung durchgeführt.

3.3.2.3. Einstellen der Zellsuspensionen

Die Zellkonzentration wurde durch Auszählen in einer Zählkammer nach FUCHS-ROSENTHAL ermittelt. Ausgewertet wurden nur Zellen, die keine Anzeichen des Zellunterganges erkennen ließen. Die erforderliche Zelldichte wurde durch Verdünnen der Ausgangssuspension mit Hanks- bzw. HU-haltiger Hanks-Lösung hergestellt.

3.3.2.4. Anfärbbarkeit mit Trypanblau

Da die intakte Zellmembran für Trypanblau impermeabel ist, wurden zur Überprüfung der Zellvitalität 100 μl der eingestellten Zellsuspension mit 10 μl einer 2 %igen Trypanblaulösung vermischt. Der prozentuale Anteil gefärbter Zellen von mindestens 500 ausgewerteten Zellen wurde lichtmikroskopisch in der FUCHS-ROSENTHAL-Zählkammer ermittelt.

Vorbemerkung zur Bestimmung der Nucleinsäuresynthese

Die Nucleinsäuresynthese wurde über den Einbau radioaktiv markierter Nucleinsäurevorstufen in die säurefällbare, hydroly-

sierbare Zellfraktion bestimmt.

Im einzelnen wurden folgende Versuchsmethoden angewendet:

3.3.3. Semikonservative DNA-Synthese (SDS)

3.3.3.1. In vitro-Markierung der DNA mit ^3H -Thymidin (^3H -dT)

3.3.3.1.1. Aufteilen der Zellsuspension

Die je nach erforderlicher Zellkonzentration eingestellte Zellsuspension wurde in die vorgesehene Anzahl Einzelansätze zu 1 ml aufgeteilt und in Reaktionsgefäße (EPPENDORF 3812) pipettiert.

3.3.3.1.2. Vorinkubation

Bei Untersuchungen der DDC-Wirkung auf die Zellsuspension (in vitro-Wirkung) wurden den Einzelansätzen die gewünschten DDC-Konzentrationen, in 100 μl Hanks-Medium gelöst, zugesetzt. Kontrollansätze erhielten einen Zusatz von 100 μl DDC-freier Hanks-Lösung. Die Einzelansätze wurden 30 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln im Wasserbad vorinkubiert, anschließend 8 s bei $9.980 \times g$ (EPPENDORF-Zentrifuge 5412) abgeschleudert und das erhaltene Zellsediment in 1,75 ml DDC-freier Hanks-Lösung resuspendiert.

Wurde DDC in vivo appliziert, entfiel die Vorinkubation.

3.3.3.1.3. Hauptinkubation (Markierungsansatz)

Nach Aufteilen der Einzelansätze auf 3 Proben zu jeweils 0,5

ml in Reaktionsgefäße wurden den Zellsuspensionen 50 µl ^3H -dT (1,25 µCi bzw. 46,25 KBq) zugesetzt. Anschließend erfolgte die Hauptinkubation (90 min bei 37 °C).

3.3.3.1.4. Fällung und Waschen

Intrazelluläre Aufnahme und Einbau von ^3H -dT in die DNA wurden durch Fällung mit 1 ml kalter Perchlorsäure (1,5 mol/l) beendet. Anschließend wurden die Ansätze 15 min bei -15 °C im Eisfach gelagert. Zur Ermittlung der Untergrundradioaktivität wurden Kontrollproben unmittelbar nach Zusatz von ^3H -dT gefällt und bis zur weiteren Aufarbeitung ins Eisfach verbracht. Nach Kühlagerung wurden alle Ansätze 5 min bei 6.500 x g zentrifugiert (EPPENDORF-Zentrifuge 5413); das dabei gewonnene Sediment wurde zweimal mit 1 ml Perchlorsäure (1 mol/l) gewaschen.

3.3.3.1.5. Hydrolyse

Zur Solubilisierung des DNA-haltigen Sedimentes wurden 2 ml Perchlorsäure (1 mol/l) zugesetzt. Durch 20minütiges Erhitzen der Proben bei 90 °C im Wasserbad, anschließende Kühlung für 20 min bei -15 °C im Eisfach und erneute Zentrifugation (10 min, 6.500 x g) wurde das erforderliche Hydrolysat als Überstand zur Messung der Radioaktivität und des Nucleinsäuregehaltes gewonnen.

3.3.3.1.6. Aktivitätsmessung

Zur Ermittlung der Radioaktivität wurden 0,5 ml des Hydrolysesates mit 3 ml Flüssigszintillator Quickszint^R 402 in Polypropylen-Zählhülsen (ZINSSER Minivials 3000882) vermischt. Die Messung der Impulsrate wurde in einem Flüssigszintillationsspektrometer (BECKMANN LS 230) (Meßdauer 10 min) durchgeführt. Die Korrektur des Quencheffektes erfolgte über einen internen Standard (Internal standard kit for liquid szintillation counting, ³H-W for water samples, LKB-WALLAC 1210-121).

3.3.3.2. In vivo-Markierung der DNA mit ³H-Thymidin (³H-dT)

Zur Untersuchung der in vivo-³H-dT-Einbauraten in die DNA wurde den Tieren 1 h nach DDC-Applikation 1 µCi (37 KBq) ³H-dT pro g KG i.p. injiziert. Nach einer weiteren Stunde wurden die Tiere dekapitiert und die Zellsuspensionen gewonnen. Die Zellkonzentrationen betrugen 30×10^6 Knochenmarkszellen/ml und 60×10^6 Thymuszellen/ml. 2 ml dieser Zellsuspensionen wurden 8 s bei $9.980 \times g$ abgeschleudert und das erhaltene Zellsediment in 1,75 ml Hanks-Lösung resuspendiert. Die weitere Aufarbeitung der Proben erfolgte wie unter 3.3.3.1.4. ff. beschrieben.

3.3.4. Unprogrammierte DNA-Synthese (UDS)

Da die reparaturbedingte, unprogrammierte DNA-Synthese (UDS) nur in geringem Umfang an der Gesamt-DNA-Syntheseleistung der

Zelle partizipiert, ist es notwendig, zur Untersuchung des Reparaturanteiles die replikative Synthese möglichst quantitativ auszuschalten. Die DNA-Replikation kann durch Hydroxyharnstoff über eine Blockade des Ribonucleosid-Diphosphat-Reduktase-Systems gehemmt werden (80), ohne die Reparaturkapazität der Zelle wesentlich zu beeinträchtigen (102). Die UDS wurde zusätzlich durch UV-Bestrahlung, die in erster Linie eine Langkettenreparatur (89) bewirkt, stimuliert.

Bei Versuchen zur unprogrammierten DNA-Synthese wurden die Zellansätze mit einem Zusatz von 10^{-2} mol HU/l 30 min vorinkubiert. Im Anschluß an die Vorinkubation wurden die Zellsuspensionen in sehr dünner Schicht auf eisgekühlte Petrischalen (0,045 ml/cm²) aufgetragen und mit einer UV-Lampe (PHILIPS TUV 30 W, Maximalemission bei 254 nm, Fluenz $4 \text{ J} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) bestrahlt. Zu jedem Ansatz wurde eine unbestrahlte Kontrolle den gleichen Versuchsbedingungen unterzogen. Nach Beendigung der Bestrahlung wurden die Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt, wobei die Petrischalen mit 1 ml HU-Hanks-Lösung nachgespült wurden. Sodann wurden die Ansätze 8 s abgeschleudert und das Zellsediment in 1,75 ml HU-Hanks-Lösung resuspendiert. Die weitere Verarbeitung erfolgte wie unter 3.3.3.1.3. ff. beschrieben, jedoch wurden zur Hauptinkubation 100 μl ³H-dT mit einer Aktivität von 5 μCi (185 KBq) zugesetzt und das Sediment dreimal gewaschen.

3.3.5. RNA-Synthese

Analysen zur RNA-Syntheseleistung der Zellen folgten im wesentlichen dem Versuchsablauf 3.3.3. Abweichungen ergaben sich durch 30 min Vorinkubation mit 10^{-2} mol HU/l und radioaktive Markierung der RNA mit 100 μ l 14 C-Uridin (0,2 μ Ci bzw. 7,4 KBq) je Ansatz.

3.3.6. Isotopenverdünnungsanalyse

Anhand der Isotopenverdünnungsanalysen sollten Rückschlüsse auf das Verhalten des endogenen Thymidinpools gezogen werden. Dabei wurde von folgenden Überlegungen ausgegangen:

Durch unterschiedliche Größen des endogenen Thymidinpools erfolgt eine unterschiedliche Verdünnung des in gleichbleibenden Konzentrationen zugesetzten Tracers und damit ein proportional verminderter oder gesteigerter Einbau von 3 H-dT in die DNA. Über Veränderung der endogenen Poolgrößen kann eine Substanz somit eine unterschiedliche 3 H-dT-Einbaurrate bewirken, ohne die replikative oder unprogrammierte DNA-Syntheseleistung zu beeinträchtigen.

Die exogene Zugabe unmarkierten Thymidins zum Inkubationsmedium führt zu einer konzentrationsabhängigen intrazellulären Verdünnung der markierten DNA-Vorstufe und somit zu verminderten 3 H-dT-Einbauraten. Sind die endogenen Poolgrößen bei Zufuhr unmarkierten Thymidins bereits verändert, müßte sich dies in einer bei Kontrollansätzen und behandelten Proben unterschiedlichen Hemmung des 3 H-dT-Einbaues ausdrücken: Bei einem expandierten Pool bewirkt der Zusatz einer bestimmten

Menge unmarkierten Thymidins eine geringere Verdünnung des Tracers als bei einem verkleinerten Thymidinpool. Dies bedeutet, daß zur Erzielung der gleichen ^3H -dT-Einbauhemmung bei Expansion des endogenen Pools mehr, bei Kontraktion des Pools dagegen weniger unmarkiertes Thymidin zugesetzt werden muß. - Anders ausgedrückt: Beruht eine durch Behandlung von Zellen ausgelöste Änderung des Thymidineinbaues ausschließlich auf Veränderung der endogenen dT-Pool-Größe, ist der beobachtete Effekt seinem Umfang nach durch Zusatz exogenen (unmarkierten) dT zu beeinflussen. Liegt ein solcher Einfluß nicht vor, wird im allgemeinen davon ausgegangen, daß Änderungen des endogenen dT-Pools nicht zur Erklärung des veränderten Tracereinbaues herangezogen werden können.

Nach Zusatz steigender Molaritäten unmarkierten Thymidins in 100 μl Hanks-Lösung wurden die Zellen 30 min vorinkubiert. Im Falle der DDC-Wirkung in vitro wurde unmarkiertes Thymidin in Gegenwart der entsprechenden DDC-Konzentrationen zugegeben. Als Kontrolle diente ein Ansatz, welchem 100 μl DDC-freier Hanks-Lösung zugesetzt worden war. Bezugspunkt (keine Beeinflussung der ^3H -dT-Inkorporation durch unmarkiertes Thymidin) war ein Ansatz mit 100 μl Thymidin-freier Hanks-Lösung. Zentrifugation und Mediumwechsel führten im weiteren Versuchsablauf zu den unter 3.3.3.1.3. ff. beschriebenen Schritten.

3.3.7. Nucleoidsedimentation

Die Nucleoidsedimentation wurde in Anlehnung an die von WENIGER beschriebene Methode durchgeführt (109). Das Prinzip der Methode beruht auf einer vorsichtigen Lyse der Zellen mit einem nichtionischen Detergenz bei hoher Salzkonzentration. Durch anschließende Zentrifugation in einem neutralen Ethidiumbromid-haltigen Saccharose-Gradienten kann die Form und Position des DNA-Ethidiumbromid-Komplexes aufgrund seiner Fluoreszenz im UV-Licht ohne Fraktionieren des Gradienten bestimmt werden. Bei intakter DNA stellt diese einen kompakten Komplex mit einer hohen Sedimentationskonstanten dar. Mit dieser sehr sensitiven Methode kann schon eine geringgradige DNA-Schädigung nachgewiesen werden. Einzelstrangbrüche führen zu einer höheren freien Drehbarkeit der DNA und zum Verlust der superhelikalen Windungen. Daraus resultiert eine Strukturlockerung und damit eine verringerte Sedimentationskonstante.

3.3.7.1. Herstellen des Gradienten

Mit einem Gradientenmischer (TEGIMENTA AG Rotkreuz, Schweiz) wurde in 6 Zellulosenitratröhrchen (BECKMANN Centrifuge tubes 33137) ein linearer Saccharosegradient (Saccharoselösung 15 bis 30 %) hergestellt. Dabei wurden die Röhrchen (Volumen ca. 10 ml) bis zu einem Abstand von 10 mm vom oberen Rand gefüllt und zur Festigung des Gradienten etwa 15 h bei 4 °C in einer Kühlzelle aufbewahrt. Danach wurden auf jeden Gradienten 0,34 ml Lyselösung aufgetragen (Herstellung der Lösungen siehe 3.1.).

3.3.7.2. Zellsuspension

Die Zellsuspensionen wurden nach 3.3.2.2. hergestellt und auf eine Zellkonzentration von 15×10^6 Zellen/ml eingestellt. Von der eingestellten Zellsuspension wurden 0,25 ml auf die mit Lyselösung bedeckten Gradienten geschichtet.

3.3.7.3. Lyse

Die Zellulosenitratröhrchen wurden nunmehr in die Schwenkbecher des Rotors verbracht und die Zellen abgedunkelt 30 min bei Zimmertemperatur der Lyselösung ausgesetzt.

3.3.7.4. Zentrifugation

Die sich anschließende 90 min. Zentrifugation wurde bei 20 °C und $76.400 \times g$ durchgeführt (BECKMANN Ultrazentrifuge L 2, Rotor SW 41).

3.3.8. Intrazelluläre ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metaboliten-Konzentration und ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metaboliten-Rücktransport

3.3.8.1. Vorinkubationen

Die Thymozytensuspension wurde nach der unter 3.3.2.2. beschriebenen Methode gewonnen, mit 10^{-2} mol HU/l Hanks-Lösung auf 30×10^6 Zellen/ml eingestellt und in Volumina von 1 ml auf Reaktionsgefäße aufgeteilt. Nach 30 min. Vorinkubation bei 37 °C im Schüttelbad wurden den Zellsuspensionen 50 μl ^3H -dT (5 μCi bzw. 185 KBq) zugemischt und 30 min weiterinkubiert.

3.3.8.2. Extrazelluläre ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metaboliten-Konzentration

Danach wurden die Zellen abgeschleudert, dreimal mit 1 ml HU-Hanks-Lösung gewaschen, in 1,5 ml warmer HU-Hanks-Lösung resuspendiert und erneut in das Wasserbad verbracht. Eine Probe wurde sofort nach Resuspension 6 s bei $9.980 \times g$ zentrifugiert. Dem Überstand wurden $2 \times 0,5$ ml entnommen und entsprechend

3.3.3.1.6. auf ^3H -Aktivität gemessen. Der verbleibende Überstand wurde vollständig abgehoben, das Zellsediment mit 1,5 ml Perchlorsäure ($1,5 \text{ mol/l}$) gefällt und in ein Eisbad gestellt. Die übrigen Ansätze wurden im Abstand von 5 min dem Wasserbad entnommen und entsprechend behandelt.

3.3.8.3. Intrazelluläre ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metaboliten-Konzentration

Nach Fällung der letzten Probe wurden die Ansätze 30 min auf Eis gehalten und anschließend 5 min bei $9.980 \times g$ zentrifugiert. Vom Überstand wurden $2 \times 0,5$ ml flüssigszintillations-spektrometrisch gemessen, der restliche Überstand wurde verworfen.

3.3.8.4. ^3H -dT-Einbau in die DNA

Zur Ermittlung des ^3H -dT-Einbaues in die DNA wurde wie unter 3.3.3.1.5. f. verfahren.

3.3.9. Phosphorylierungsmuster

Anhand der Phosphorylierungsprodukte des intrazellulär aufgenommenen ^3H -dT sollten Rückschlüsse auf eventuelle Störungen des DNA-Vorstufenmetabolismus (z.B. ATP-Versorgung, veränderte Kinasenaktivität) gezogen werden.

3.3.9.1. Herstellen der Probe

Die nach 3.3.2.2. gewonnene Zellsuspension wurde auf 4×10^7 Zellen/ml eingestellt. Zu 1,5 ml dieser Zellsuspension wurden 100 μl ^3H -dT (NEW ENGLAND NUCLEAR, NET-D27) entsprechend einer Aktivität von 20 μCi (740 KBq) zugesetzt. Nach 30 min. Inkubation und dreimaligem Waschen mit 1 ml Hanks-Lösung wurde das Zellsediment mit 100 μl kalter Perchlorsäure (1,5 mol/l) gefällt, 20 min bei -15°C gekühlt und 5 min zentrifugiert ($9.980 \times g$).

3.3.9.2. Chromatographische Trennung der phosphorylierten Thymidinstufen *

20 μl des erhaltenen Überstandes wurden chromatographisch nach einer von ALTSCUH und UNGEMACH entwickelten Methode mittels HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) -Technik aufgetrennt (4). Hierbei wurden 2 min-Fractionen, entsprechend einem Volumen von 2 ml, gesammelt, mit 3 ml Fertigszintillator vermischt und radiometrisch auf ihre ^3H -Aktivitäten gemessen. Die resul-

* Herrn C.Altshuh am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Tierärztliche Fakultät der Universität München, möchte ich an dieser Stelle für die Durchführung der Versuche danken.

tierenden Peaks des Radiogrammes konnten durch Eichläufe mit den Reinsubstanzen anhand der Retentionszeiten identifiziert werden. Die Darstellung des Eichchromatogrammes erfolgte durch Extinktionsmessung bei 254 nm.

3.3.10. DNA-Konzentration

3.3.10.1. Photometrische Messung

1 ml des nach 3.3.5. gewonnenen Überstandes wurde bei 260 nm (Absorptionsmaximum für Nucleinsäuren) im Spektralphotometer (PMQ II, ZEISS, Stuttgart) auf seine Extinktion hin gemessen. Als Referenzlösung diente eine DNA-freie Perchlorsäurelösung (1 mol/l). Die DNA-Konzentration oder Zellzahl wurde anhand einer Eichkurve bestimmt.

3.3.10.2. Fluorimetrische Messung

Nach der von FISZER-SZAFARZ et al. beschriebenen Methode (29) kann der DNA-Gehalt einer Probe ohne vorherige DNA-Extraktion spektrofluorimetrisch (113) bestimmt werden. Dabei wird ein Zellsediment in Triton X-100 und Ammonium solubilisiert, mit DABA-Lösung (3,5-Diamino-Benzoesäure) zur Reaktion gebracht und spektrofluorimetrisch gemessen. Mit dieser Methode sind bereits sehr geringe DNA-Mengen (10 ng) nachzuweisen.

3.3.10.2.1. DABA-Reagenz

1,5 g DABA wurden 2 min in 5 ml HCl (4 mol/l) gelöst, weitere 2 min mit 0,75 g Aktivkohle verrührt und anschließend 10 min

zentrifugiert ($12.000 \times g$). Nach Filtrierung des Überstandes wurde das Reagenz bis zur Verwendung im Dunkeln aufbewahrt (etwa 2 h haltbar).

3.3.10.2.2. Herstellen der Meßprobe

1 ml einer Zellsuspension wurde 30 s zentrifugiert ($9.980 \times g$) und das Sediment in 1 ml NH_4OH -Lösung (1 mol/l), die 0,2 % Triton X-100 (V/V) enthielt, resuspendiert. Nach einstündigem Erhitzen bei 100°C im Wasserbad wurde das ursprüngliche Volumen mit NH_4OH -Lösung (1 mol/l) wiederhergestellt. 50 μl der Probe wurden mit 50 μl frischem DABA-Reagenz vermischt, 30 min bei 60°C erhitzt und rasch im Eisbad abgekühlt. Nach Zugabe von 800 μl HCl (1 mol/l) wurden der Ansatz 10 min zentrifugiert ($9.980 \times g$) und der Überstand im Fluoreszenzspektrometer innerhalb einer Stunde gemessen.

3.3.10.2.3. Meßbedingungen

Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte mit dem Fluoreszenzspektrometer PERKIN-ELMER MPF-4 bei einer aktivierenden Wellenlänge (λ_A) von 415 nm (Spalt 4,8 nm) und einer fluoreszierenden Wellenlänge (λ_E) von 507 nm (Spalt 12 nm). Anhand einer Eichkurve mit reiner DNA-Lösung konnte die DNA-Konzentration ermittelt werden.

3.3.11. Überprüfung der ^3H -dT-Charge *

Um Fehlinterpretationen, die durch unspezifische Tritiumimpulse bedingt sein können, zu vermeiden, wurde die ^3H -markierte Thymidincharge chromatographisch auf ihre radiochemische Reinheit überprüft. 20 μl unmarkierte Reinsubstanz (1,25 mmol Thymidin/l) wurden mittels "Reversed-phase-Chromatographie" auf einer HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) -Anlage der Fa.KONTRON ANALYTIC GmbH (RP-18 Säule) aufgetrennt und die Retentionszeit des Thymidins ermittelt. Als Fließmittel diente ein 20 %iges (V/V) Methanol-Wasser-Gemisch mit einer Flußrate von 1 ml/min. Die Darstellung der Chromatogramme erfolgte durch Extinktionsmessung bei 254 nm.

Der Original- ^3H -dT-Charge wurde eine Probe von 10 μl entnommen und - um die Kontamination der Chromatographiesäule möglichst niedrig zu halten - im Verhältnis 1:500 mit Aqua bidest. verdünnt. Diese ^3H -dT-Konzentration ergab jedoch bei 254 nm keine meßbare Extinktion. Daher wurden 20 μl der verdünnten Probe mit 240 μl der unmarkierten Reinsubstanz (1,25 mmol Thymidin/l) vermischt. Von dieser Lösung wurden 20 μl auf die oben genannte HPLC-Säule aufgetragen und in Fraktionen zu 16 Tropfen gesammelt. Die gleichzeitige Messung im UV-Bereich (254 nm) erbrachte jetzt ausreichend hohe Extinktionen; der Peak des Chromatogrammes zeigte die gleiche Retentionszeit wie die vorherigen Eichläufe mit unmarkiertem Thymidin. Die Fraktionen wurden mit

* Herrn Dr.I.Schmerold am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Tierärztliche Fakultät der Universität München, danke ich für seine Unterstützung bei der Durchführung dieser Versuche.

3 ml Quickszint^R 402 vermischt, flüssigszintillationsspektrometrisch gemessen und im Radiogramm dargestellt. Bei Thymidin-gebundener ³H-Aktivität mußte der Peak des Radiogrammes mit dem Peak der Extinktionsmessung bei 254 nm auftreten.

3.4. Auswertung der Ergebnisse

3.4.1. Markierungsmethoden

Aus den flüssigszintillationsspektrometrisch gemessenen Impulsen (cpm) wurde nach Abzug der Untergrundradioaktivität die tatsächliche Zerfallsrate (dpm) ermittelt. Da die Standardisierungsfaktoren der Proben nur geringfügige Schwankungen aufwiesen, wurde die Quenchkorrektur anhand eines internen Standards durchgeführt. Die Zerfälle/min (dpm) wurden auf den jeweiligen DNA-Gehalt der Probe bezogen und für 1 mg DNA berechnet.

Die prozentuale Darstellung der in vitro-Analysen erfolgte durch Bezug der dpm/mg DNA auf die Werte der unbehandelten Kontrollprobe. Bei in vivo-Analysen wurde zu jedem untersuchten Wert ein scheinbehandeltes Tier im gleichen Analysengang mitgeführt und diente hierbei als prozentualer Bezugspunkt für diesen untersuchten Wert.

Eine weitere Möglichkeit der Ergebnisdarstellung zeigen die Versuche zur intrazellulären ³H-dT-Konzentration und ³H-dT-Rücktransportrate. Anhand der Aktivitätskonzentration und der spezifischen Aktivität des Tracers kann über die Zerfalls-

raten die molare ^3H -dT-Konzentration der Probe errechnet werden. Als Bezugspunkt wurde hier - ebenso wie bei der RNA-Synthese - die Zellzahl gewählt.

3.4.2. Nucleoidsedimentation

Die Position des DNA-Ethidiumbromid-Komplexes wurde unter einer UV-Lampe (Emission bei 366 nm) sichtbar gemacht, die Sedimentationsstrecke gemessen und prozentual auf die durchschnittliche Sedimentationsstrecke der Kontrollproben bezogen.

3.5. Statistische Auswertung und graphische Darstellung

3.5.1. Mittelwert und Standardabweichung

Innerhalb einer Versuchsreihe wurden die Mittelwerte der Parallelansätze berechnet. Bei Wiederholungsanalysen wurden die so erhaltenen Werte der Einzelversuche gemittelt und graphisch dargestellt; die Längsstriche zeigen die Standardabweichungen.

3.5.2. Signifikanzanalyse

Werte, die nur geringe Effekte erkennen ließen oder hohe Standardabweichungen zeigten, wurden einer Signifikanzanalyse unterzogen. Die Mittelwerte wurden anhand des t-Testes nach STUDENT mit $p \leq 0,05$ verglichen.

3.5.3. Lineare Regression

Ließen die Kurven einen nahezu linearen Verlauf erkennen, wurden die lineare Regressionsgerade und der Korrelationskoeffizient r berechnet.

4. ERGEBNISSE

4.1. Versuche zur Methodik

Da in früheren Arbeiten bereits Versuche zur SDS und UDS an Thymus- und Milzzellen der Ratte durchgeführt (40,101,114) und dabei die Versuchsbedingungen so weit wie möglich optimiert worden waren, sollte an dieser Stelle v.a. die Übertragbarkeit der Methodik auf Knochenmarkszellen untersucht werden.

4.1.1. Einfluß der Inkubationszeit auf die Zellkonzentration

Untersuchungen an Milzzellen (40) hatten gezeigt, daß das gewählte Hanks-Medium im Vergleich zu einem hochwertigen Nährmedium für Kurzzeitanalysen ausreicht. Da jedoch bei längeren Inkubationszeiten (120 bis 240 min) mit zunehmendem Zelluntergang gerechnet werden muß, sollte dieser Effekt auch an Knochenmarkszellen untersucht werden. Zur Ermittlung der Zellüberlebensrate wurden die Zellsuspension auf 8×10^6 Zellen/ml eingestellt und nach entsprechenden Inkubationszeiten die Zellzahl bestimmt. Ausgewertet wurden nur Zellen, die im mikroskopischen Bild keine Anzeichen von Zytolyse erkennen ließen.

Ein zunächst während der ersten 15 min nach Ansatz rascher Abfall der Zellkonzentration setzte sich mit zunehmender Inkubationszeit nur langsam fort (Abb.1). Nach 120 min war die Zellkonzentration um etwa 20 % verringert. Die Standardabweichungen (durchschnittlich 0,56 %) konnten bei dem gewählten Maßstab nicht dargestellt werden.

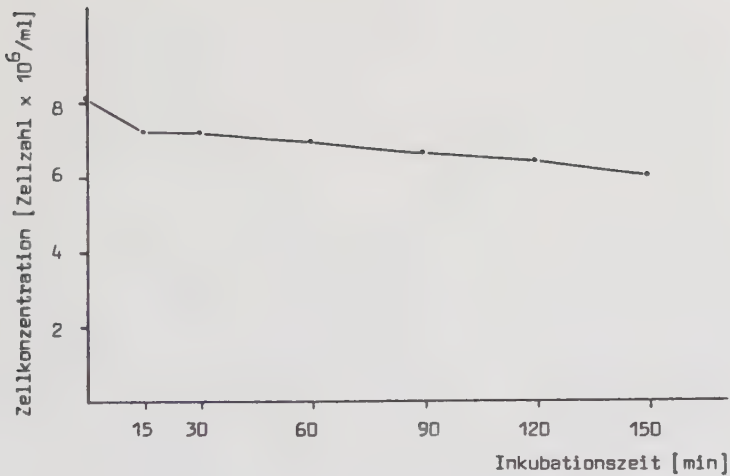


Abb.1: Knochenmarkszellen. Zellkonzentration in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Ausgangskonzentration: 8×10^6 Zellen/ml. $n = 3$.

4.1.2. Semikonservative DNA-Synthese

4.1.2.1. ^3H -dI-Einbau in Abhängigkeit von der Zellkonzentration

Wie in Abb.2 dargestellt, nahm die ^3H -Aktivität der säurefällbaren Fraktion für den untersuchten Bereich von 2 bis 8×10^6 Zellen/ml bei 60 min. Inkubation direkt proportional zur Zellkonzentration zu (Lineare Regressionsgerade: $y = -14.794 + 14.707 x$; $r = 0,9973$). Eine Erklärung für die Abweichung der Geraden vom Nullpunkt kann vorliegend nicht gegeben werden.

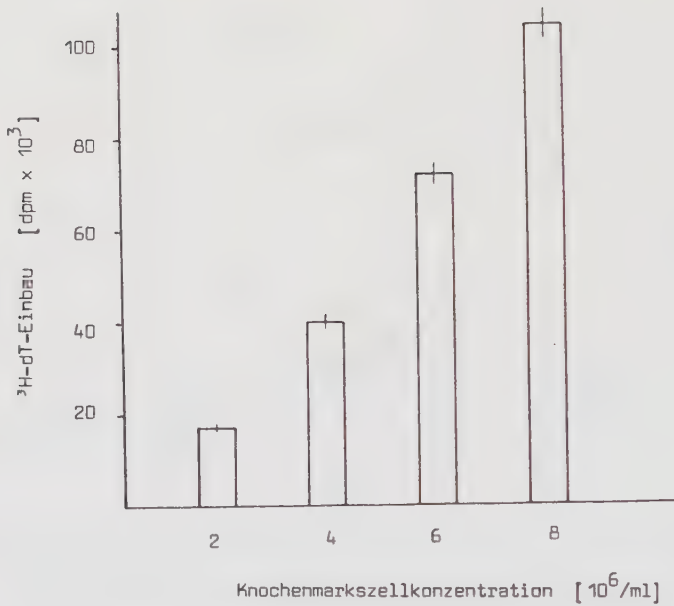


Abb.2: Knochenmarkszellen. Semikonservativer $^3\text{H-dT}$ -Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der Zellkonzentration. Hauptinkubation: 60 min. $n = 3$.

4.1.2.2. $^3\text{H-dT}$ -Einbau in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Mit zunehmender Inkubationszeit zeigte sich - bei einer Zellkonzentration von 8×10^6 Zellen/ml - ein zunächst steiler, etwa ab 100 min flacher werdender Anstieg des $^3\text{H-dT}$ -Einbaues. Mit einer gewissen Sättigung des Einbaues ist somit erst bei verhältnismäßig langen Inkubationszeiten zu rechnen (Abb.3).

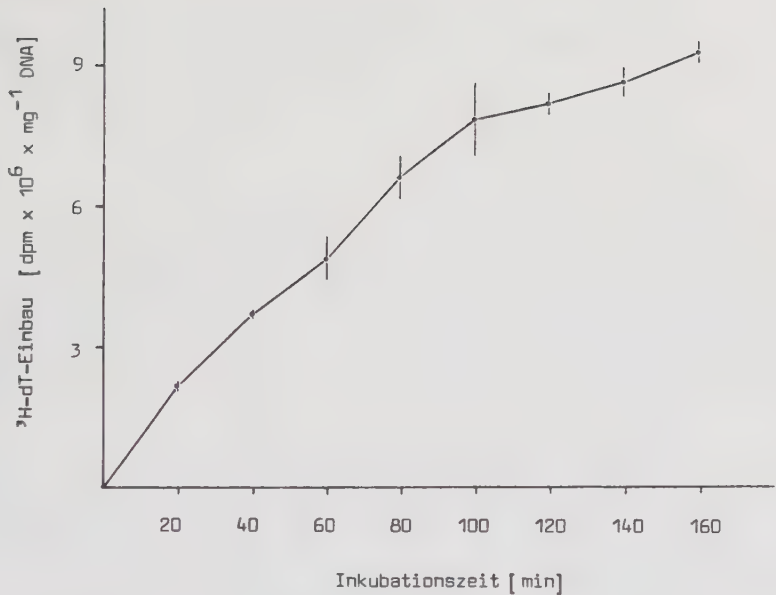


Abb.3: Knochenmarkszellen. Semikonservativer $^3\text{H-dT}$ -Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. 8×10^6 Zellen/ml. $n = 3$.

4.1.2.3. $^3\text{H-dT}$ -Einbau in Abhängigkeit von der UV-Dosis

Während eine Bestrahlungsdosis von $8 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$ ohne Einfluß auf die semikonservative $^3\text{H-dT}$ -Einbaurrate blieb, zeigte sich ab $16 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$ eine signifikante Abnahme der ^3H -Aktivität (Abb.4). Bei einer UV-Dosis von $128 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$ betrug der $^3\text{H-dT}$ -Einbau in die DNA nur noch 50 % der unbestrahlten Kontrollwerte.

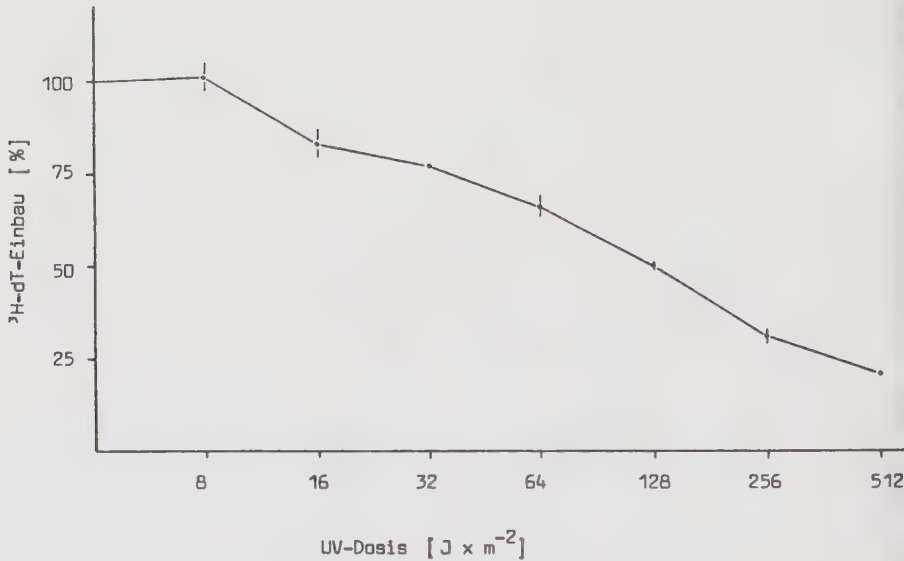


Abb.4: Knochenmarkszellen. Semikonservativer $^3\text{H-dT}$ -Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der UV-Dosis.
 8×10^6 Zellen/ml. Hauptinkubation: 90 min. $n = 3$.
100 % = $6.998.147 \pm 40.080$ dpm/mg DNA.

4.1.3. Unprogrammierte DNA-Synthese

$^3\text{H-dT}$ -Einbau in Abhängigkeit von der UV-Dosis

4.1.3.1. Knochenmarkszellen

Die Prüfung des Bestrahlungseinflusses erbrachte bei niedrigen UV-Dosen ($8 - 32 \text{ Jxm}^{-2}$) eine Zunahme des unprogrammierten $^3\text{H-dT}$ -Einbaues zwischen 15 und 30 % (Abb.5). Bei

weiterer Erhöhung der UV-Dosis verhielt sich der ^3H -dT-Einbau rückläufig und fiel ab $128 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$ unter die Werte der unbestrahlten Kontrollen.

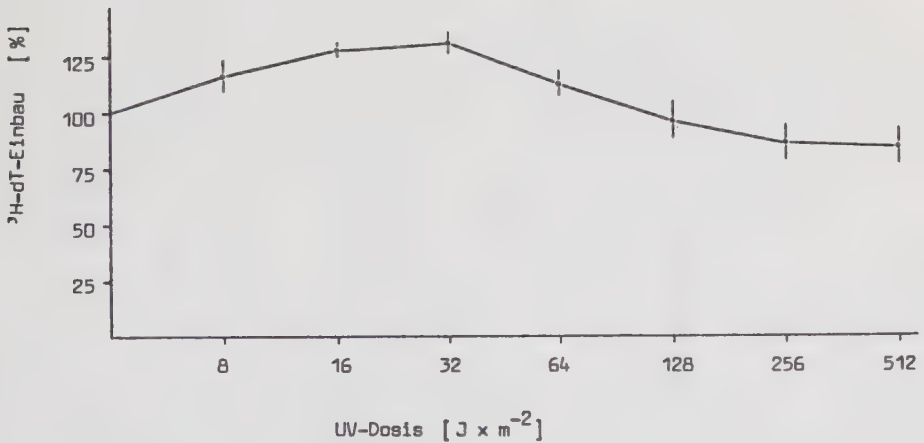


Abb.5: Knochenmarkszellen. Unprogrammierter ^3H -dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der UV-Dosis. 10^7 Zellen/ml. Hauptinkubation: 90 min. $n = 3$.
100 % = 681.273 ± 21.344 dpm/mg DNA.

Da sich die Werte bei Bestrahlungsdosen von 16 und $32 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$ nicht signifikant unterschieden, wurden mehrere Wiederholungsanalysen zur Ermittlung der hinsichtlich UDS-Stimulierung "optimalen" UV-Dosis durchgeführt (nicht eigens dargestellt). Auch hier konnte - bei in der Tendenz gleichbleibendem Kurvenverlauf - keine eindeutige Maximaldosis festgestellt werden. Die höchsten ^3H -dT-Einbauraten lagen im Dosisbereich von

16 und $32 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$. In insgesamt 9 Ansätzen ergab eine UV-Bestrahlung mit $32 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$ einen mittleren Anstieg der unprogrammierten ^3H -dT-Einbaurrate von 26 % (Abb.6).

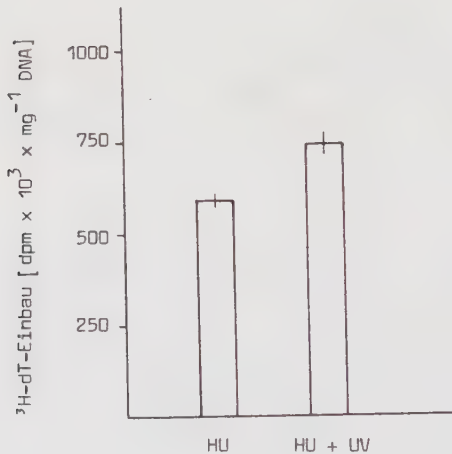


Abb.6: Knochenmarkszellen. Unprogrammierter ^3H -dT-Einbau in die DNA nach UV-Bestrahlung mit $32 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$. 10^7 Zellen/ml. Hauptinkubation: 90 min. $n = 9$.

4.1.3.2. Thymuszellen

Die UV-Dosis von $64 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$, bei der Thymuszellen in Versuchen zur UDS eine maximale Steigerung der ^3H -dT-Einbaurrate um etwa 70 % gezeigt hatten (114), sollte auch in den

vorliegenden Untersuchungen beibehalten werden. Jedoch wies der unprogrammierte ^3H -dT-Einbau der Thymozyten nach Hemmung der semikonservativen DNA-Synthese durch Hydroxyharnstoff vorliegend eine so niedrige Ausbeute auf, daß die gemessene Zerfallsrate bei einer Zellkonzentration von $8 \times 10^6/\text{ml}$ nur geringfügig über den Untergrundwerten lag. Eine Erhöhung der Zellzahl auf $4 \times 10^7/\text{ml}$ führte zu aussagekräftigen Ergebnissen. Die unprogrammierte ^3H -dT-Einbaurrate der Thymuszellen konnte durch eine UV-Bestrahlung mit $64 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$ um 58 % stimuliert werden (Abb.7).

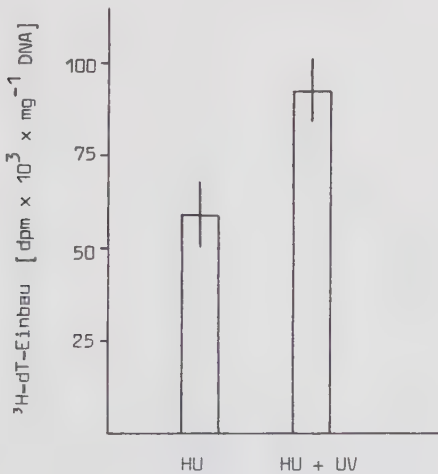


Abb.7: Thymuszellen. Unprogrammierter ^3H -dT-Einbau in die DNA nach UV-Bestrahlung mit $64 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$. 4×10^7 Zellen/ml. Hauptinkubation: 90 min. $n = 9$.

4.1.4. Isotopenverdünnung

Hinweise auf mögliche Veränderungen des endogenen Thymidin-pools und ihren Einfluß auf den ^3H -dT-Einbau in die DNA sollten durch Zugabe unmarkierten Thymidins in Konzentrationen von 1 bis 128 $\mu\text{g/ml}$ (4,1 bis 528,9 $\mu\text{mol/l}$) während der Vorinkubation gewonnen werden (Abb.8). Erwartungsgemäß wurde der Einbau von ^3H -dT durch steigende Konzentrationen unmarkierten Thymidins zurückgedrängt. Eine 50 %ige Hemmung konnte durch Zusatz von 3 $\mu\text{g dT/ml}$ (12,3 $\mu\text{mol/l}$) erreicht werden.

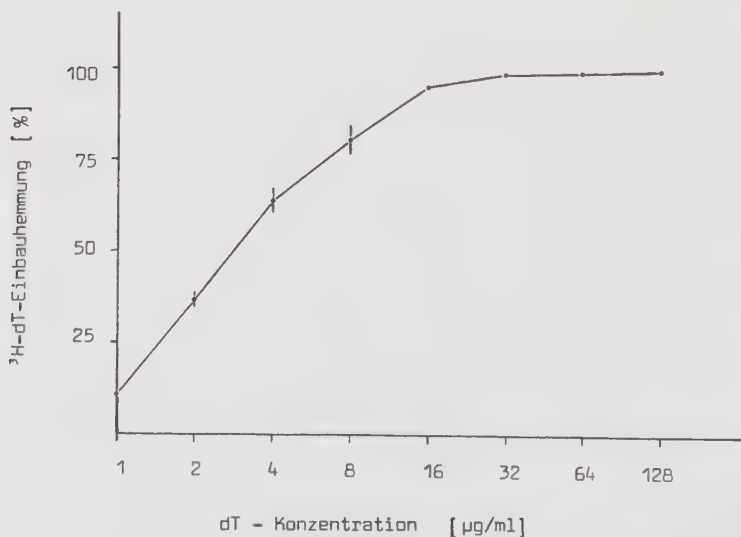


Abb.8: Thymuszellen. Hemmung des semikonservativen ^3H -dT-Einbaues in die DNA durch unmarkiertes Thymidin, konzentrationsabhängig. 8×10^6 Zellen/ml. Hauptinkubation: 90 min. $n = 6$.

4.1.5. Nucleoidsedimentation

4.1.5.1. Einfluß von Ganzkörperstrahlungsbestrahlung auf die Nucleoidsedimentation

Ganzkörperstrahlungsbestrahlung mit einer Energiedosis von 4 Gy (400 R) zeigte keine signifikante Änderung der Sedimentationsstrecken. Bei einer Verdoppelung der Strahlendosis auf 8 Gy (800 R) blieben die Thymusnucleoide der bestrahlten Tiere in ihrer Sedimentation gegenüber den Kontrolltieren um 35 % zurück (Abb.9). Die Struktur des DNA-Ethidiumbromid-Komplexes der strahlungsbestrahlten Proben war deutlich aufgelockert und wies eine Verbreiterung der Banden auf.

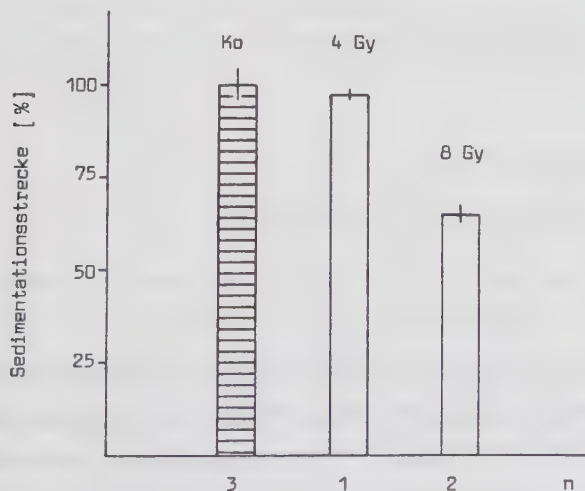


Abb.9: Thymuszellen. Sedimentation von Thymusnucleoiden der Ratte unmittelbar nach Ganzkörperstrahlungsbestrahlung mit einer Energiedosis von 4 und 8 Gy. n = Anzahl der Tiere (3fach-Bestimmung je Tier).

Anmerkung zum Versuchsablauf:

Aus analysentechnischen Gründen (zeitlich versetzte Bestrahlung bzw. Scheinbestrahlung und Organaufbereitung) mußte die Zellsuspension des Kontrolltieres bis zur gemeinsamen Lyse und Zentrifugation mit den Proben des röntgenbestrahlten Tieres etwa 20 min auf Eis gehalten werden. Da die röntgenstrahleninduzierte Kurzkettenreparatur relativ schnell abläuft (Literaturangaben über Reparaturhalbwertszeiten der Einzel- und Doppelstrangbrüche schwanken zwischen 2 min und 4 h (91, 105)), könnte hierbei ein bereits einsetzender Repair des Strahlenschadens zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Daher wurde bei der Wiederholungsanalyse die Reihenfolge Kontrolltier - bestrahltes Tier umgekehrt.

4.1.6. DNA-Konzentration

4.1.6.1. Photometrische DNA-Messung

Zur Erstellung der Eichkurve wurde eine reine DNA-Lösung mit den in Abb.10 angegebenen Konzentrationen hergestellt und den gleichen Versuchsbedingungen wie die Markierungsanalysen unterworfen. Die spektrophotometrische Messung erfolgte bei 260 nm mit DNA-freier Perchlorsäure (1 mol/l) als Referenzlösung (Lineare Regressionsgerade: $y = -0,003 + 1,369 x$; $r = 0,9999$).

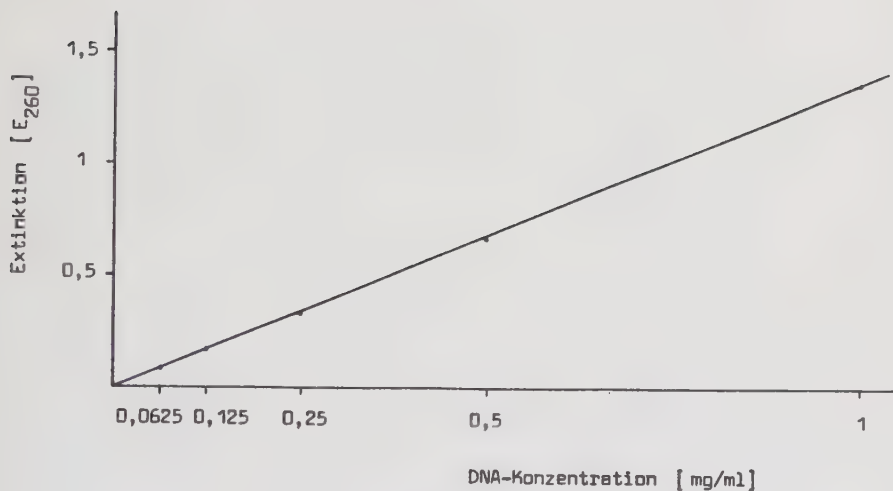


Abb.10: DNA-Eichkurve - photometrische Messung.
Extinktion E_{260} in Abhängigkeit von der DNA-Konzentration. $n = 3$.

Eine entsprechende Eichkurve wurde auch für Thymuszellsuspensionen unterschiedlicher Zellkonzentration erstellt (Abb.11) (Lineare Regressionsgerade: $y = -0,0032 + 0,0132 x$; $r = 0,9989$). Die Nullpunktabweichung liegt im Bereich der Standardabweichungen.

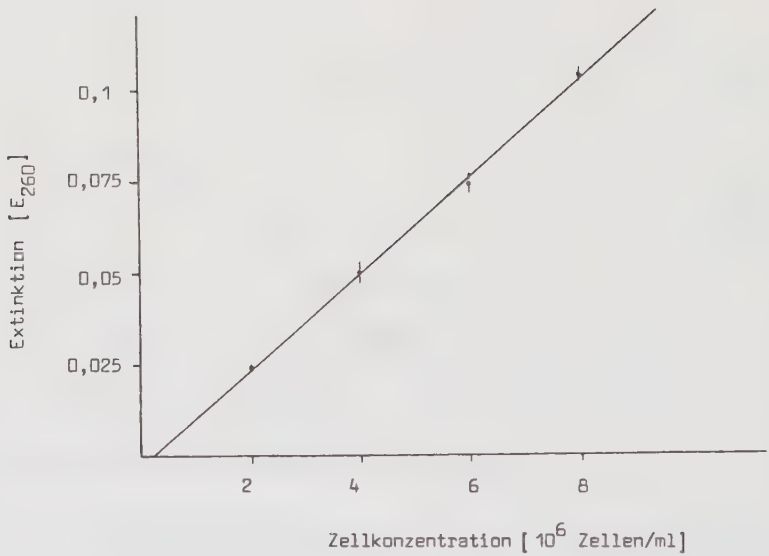


Abb.11: DNA-Eichkurve - photometrische Messung.

Extinktion E_{260} in Abhängigkeit von der Thymuszellkonzentration. $n = 3$.

Anhand der beiden Eichkurven konnte für Thymozyten ein mittlerer DNA-Gehalt von 9 pg pro Zelle errechnet werden.

4.1.6.2. Fluorimetrische DNA-Messung

Zur fluorimetrischen DNA-Bestimmung wurden reine DNA-Lösungen kleiner DNA-Konzentrationen gemessen (Abb.12) (Lineare Regressionsgerade: $y = 0,4 + 6,44 x$; $r = 0,9999$).

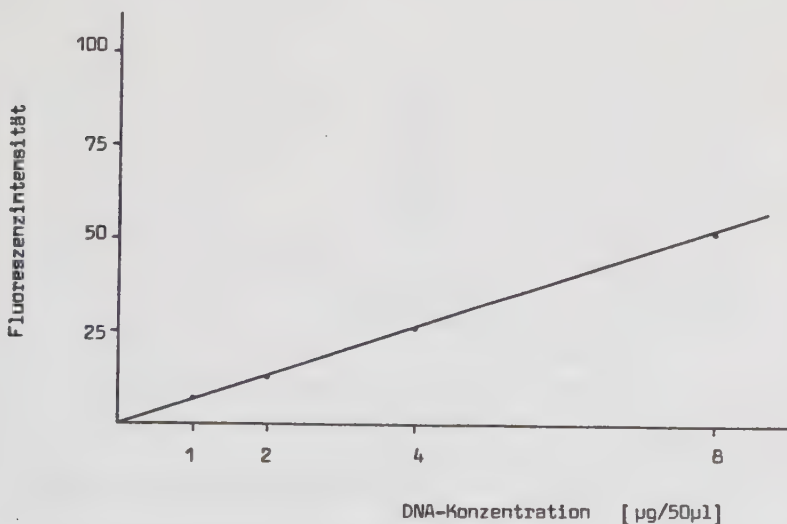


Abb.12: DNA-Bestimmung - fluorimetrische Messung. Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der DNA-Konzentration.

$\lambda_A = 415 \text{ nm}$ (Spalt 4,8 nm)

$\lambda_E = 507 \text{ nm}$ (Spalt 12 nm)

$n = 3$.

Abb.13 zeigt die fluoreszenzspektrometrische DNA-Bestimmung von Milzzellsuspensionen verschiedener Zellkonzentrationen (Lineare Regressionsgerade: $y = 2,85 + 2,56 x$; $r = 0,9967$). Eine Erklärung für die Abweichung der Geraden vom Nullpunkt kann in Übereinstimmung mit den Autoren der verwendeten Meßmethode (29) vorliegend nicht gegeben werden.

Aus den beiden MeBreihen ergab sich auch für Milzzellen ein mittlerer DNA-Gehalt von 9 pg/Zelle. Der DNA-Gehalt von Thymozyten betrug demgegenüber bei fluorimetrischer Bestimmung etwa 5 pg/Zelle.

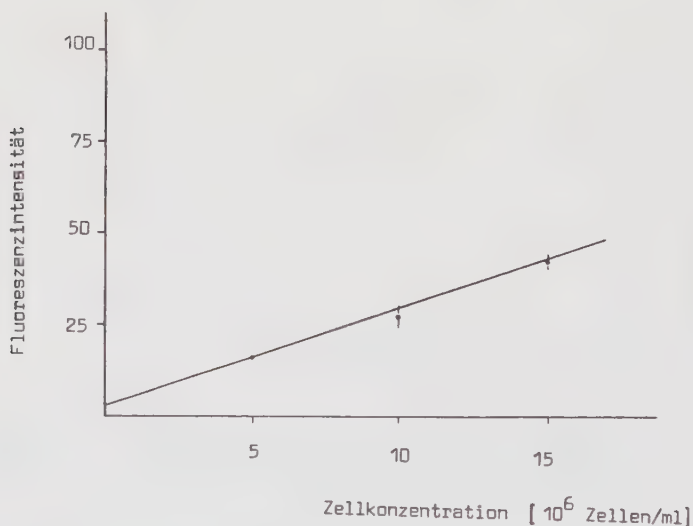


Abb.13: Fluorimetrische DNA-Bestimmung. Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Milzzellkonzentration.

$\lambda_A = 415 \text{ nm}$ (Spalt 4,8 nm)

$\lambda_E = 507 \text{ nm}$ (Spalt 12 nm)

$n = 3$.

4.1.7. Überprüfung der ^3H -dT-Charge

Das Radiogramm der ^3H -dT-Charge ergab einen ausgeprägten, nicht unterbrochenen Peak, der 96 % der Gesamtaktivität der Fraktion aufwies (Abb.14); und der nach gleicher Retentionszeit wie der

Peak der Extinktionsmessung bei 254 nm (nicht eigens dargestellt) auftrat. Somit war die gemessene Radioaktivität Thyminidin-gebunden (3.3.11.); die radiochemische Reinheit betrug 96 %. Niedrige ^3H -Aktivitäten unmittelbar vor der Hauptfraktion waren nicht dem Thyminidin zuzurechnen und sind als geringgradige Verunreinigungen (etwa 4 %) zu werten.

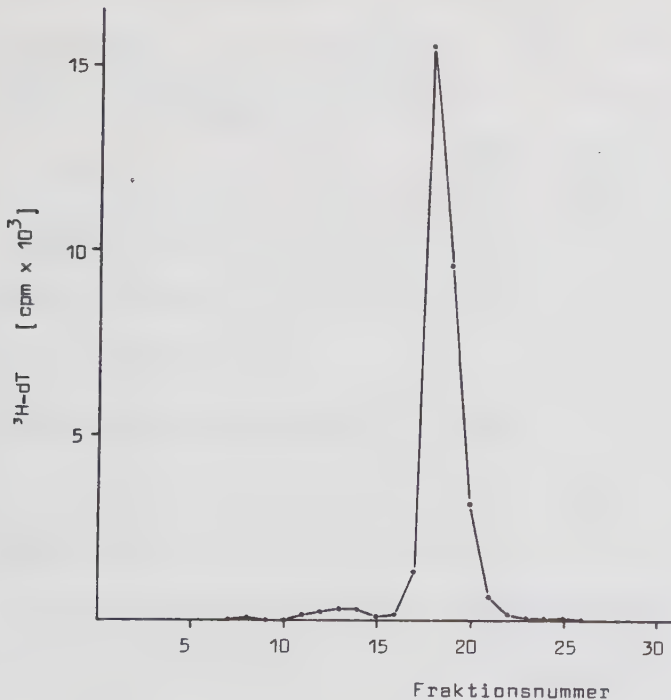


Abb. 14: Radiogramm der chromatographisch aufgetrennten ^3H -dT-Charge.

4.2. Festlegung der Versuchsbedingungen

Die Festsetzung der Versuchsbedingungen mußte unter zwei wesentlichen Gesichtspunkten erfolgen. Zum einen sollte mit möglichst geringen Aktivitätsvorlagen eine ausreichend hohe Impulsrate erreicht werden, um eine Aussage treffen zu können. Auf der anderen Seite durfte die Vitalität der Zellen durch analysenbedingte Manipulationen nicht zu stark beeinträchtigt werden. Daraus ergaben sich folgende Konditionen:

4.2.1. Zellsuspensionen

Die Aufarbeitung der einzelnen Organe wurde, wie unter 3.3.2. beschrieben, für alle durchgeführten Analysen beibehalten. Die Bestimmung der Zellraten bei fortschreitender Inkubation und der - relativ geringe - Anteil Trypanblau-gefärbter Zellen ($\leq 5\%$) hatten gezeigt, daß die Zellen für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen eine ausreichend hohe Vitalität besaßen.

Die Gesamtzellzahl der Organsuspensionen betrug etwa 300×10^6 Thymozyten/Thymus, 40×10^6 Knochenmarkszellen/Femur und 20×10^6 Knochenmarkszellen/Humerus. Diese Ausbeute der Zellisolation erwies sich als ausreichend, so daß pro Analyse nur ein Tier benötigt wurde.

4.2.2. Inkubationsmedium

Bereits frühere DNA-Markierungsversuche mit Thymus- und Milzzellen (40, 101, 114) hatten gezeigt, daß Hanks-Lösung für kurze Inkubationszeiten als "Nährmedium" ausreicht. Auch in den

vorliegenden Versuchen wurden die Zellen - nicht zuletzt um einen unmittelbaren Vergleich mit diesen Ergebnissen zu gewährleisten - in Hanks-Medium mit einem pH-Wert von 7,4 aufgenommen. Speziell Knochenmarkszellen wiesen durch schonende Manipulation bei der Organaufbereitung geringe Verluste während der Inkubationsdauer auf (Abb.1).

4.2.3. Semikonservative DNA-Synthese

4.2.3.1. In vitro-Markierung

Zur radioaktiven Markierung wurde ^3H -dT mit einer Aktivität von 1,25 μCi (46,25 KBq) zugesetzt. Die Zellkonzentration wurde auf 8×10^6 Zellen/ml eingestellt. Der ^3H -dT-Einbau nach einer Inkubationszeit von 90 min erbrachte eine ausreichend hohe Impulsrate.

4.2.3.2. In vivo-Markierung

Anhand der Vorversuche konnte nachgewiesen werden, daß der ^3H -dT-Einbau in die säurefällbare Fraktion sowohl über eine Verlängerung der Inkubationszeit als auch durch höhere Zellkonzentrationen gesteigert werden kann (Abb.2 und 3). Daher wurde die in vivo-Einbaurate des ^3H -dT einer 2 ml-Zellsuspension, die auf 30×10^6 Knochenmarkszellen/ml und 60×10^6 Thymuszellen/ml eingestellt war, gemessen. So konnte die intraperitoneale Applikation des radioaktiven Tracers auf 1 μCi (37 KBq) pro g Körpergewicht - bei einem verabreichten Volumen von 0,5 ml pro 100 g Körpergewicht - beschränkt werden.

4.2.4. Unprogrammierte DNA-Synthese

Für Analysen zur UDS wurde der Hanks-Lösung von Versuchsbeginn an Hydroxyharnstoff in einer Konzentration von 10^{-2} mol/l zugesetzt; im Unterschied zur SDS wurde 30 min vorinkubiert. Obgleich die replikative DNA-Synthese der Knochenmarkszellen durch den Ribonucleotidreductase-Hemmstoff bei weitem nicht in dem Maße zu hemmen war wie die der Thymuszellen (Abb.6 und 7), wurde für Knochenmarkszellen auf einen höheren HU-Zusatz verzichtet, um einen besseren Vergleich beider Zellsysteme zu gewährleisten. Zudem sind bei höheren HU-Konzentrationen Eigeneffekte des HU auf die DNA nicht auszuschließen (5,20).

Um eine auswertbar hohe Impulsrate zu erreichen, wurden ^3H -dT mit einer Radioaktivität von 5 μCi (185 KBq) pro Ansatz zugesetzt und die Zellkonzentration auf 4×10^7 Thymozyten bzw. 10^7 Knochenmarkszellen pro ml erhöht. Die Inkubation von 90 min dagegen wurde beibehalten, da bei längerer Dauer mit zunehmender Zytolyse zu rechnen ist (Abb.1). Zur Stimulation des unprogrammierten ^3H -dT-Einbaus wurde für Thymuszellen eine UV-Dosis von $64 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$, für Knochenmarkszellen eine solche von $32 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$ festgelegt.

4.2.5. RNA-Synthese

Der Einbau von ^{14}C -Uridin in die RNA wurde nach 30 min Vorinkubation mit 10^{-2} mol HU/l und 90 min Hauptinkubation mit einem Zusatz von 0,2 μCi (7,4 KBq) ^{14}C -U gemessen. Die Zellkonzentrationen betrugen 40×10^6 Thymozyten bzw. 25×10^6 Knochenmarkszellen pro ml.

4.2.6. Isotopenverdünnungsanalyse

Zur Verdünnung des ^3H -dT wurden die Ansätze mit unmarkiertem Thymidin in Konzentrationsstufen von 1 bis 128 $\mu\text{g/ml}$ (4,1 bis 528,9 $\mu\text{mol/l}$) 30 min vorinkubiert. Im Übrigen galten die Versuchsbedingungen 4.2.3.1.

4.2.7. Nucleoidsedimentation

Die Zellkonzentration wurde laborüblich auf 15×10^6 Thymuszellen/ml eingestellt. Nach einer Lysezeit von 30 min wurden die Ansätze 90 min bei $74.600 \times g$ zentrifugiert.

Zur Untersuchung des DDC-Effektes auf die Ganzkörperröntgenbestrahlung wurde eine Energiedosis von 8 Gy (800 R) verwendet (Abb.9).

4.2.8. Intrazelluläre ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metabolitenkonzentration und ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metaboliten-Rücktransport

Zur Hemmung der semikonservativen DNA-Synthese wurden auch in diesen Versuchen die Ansätze mit einer HU-Konzentration von 10^{-2} mol/l 30 min vorinkubiert. Die auf 30 min reduzierte Inkorporationszeit von ^3H -dT wurde durch Erhöhung der Zellzahl auf 30×10^6 Thymuszellen/ml und Zusatz von 1,25 μCi (185 KBq) ^3H -dT kompensiert.

Sollte die replikative DNA-Synthese ungehemmt bleiben, wurde des Vergleichs mit den HU-Ansätzen wegen gleichfalls 30 min vorinkubiert.

4.2.9. Phosphorylierungsmuster

Durch unterschiedliche Phosphorylierungsstufen des Thymidins wurde die zugesetzte ^3H -dT-Aktivität auf mehrere Fraktionen verteilt. Um auch geringere Konzentrationen von ^3H -dT-Metaboliten nachweisen zu können, wurden - bei einer Zellkonzentration von 4×10^7 Thymozyten/ml und einer Inkubationszeit von 30 min - 20 μCi (740 KBq) ^3H -dT zugegeben.

4.2.10. DNA-Konzentration

Die fluoreszenzspektrometrische Bestimmung der DNA erwies sich als bevorzugte Methode zum Nachweis sehr geringer DNA-Konzentrationen. Noch DNA-Mengen von 100 ng waren einwandfrei zu quantifizieren (Versuche nicht eigens dargestellt). Da der DNA-Gehalt der Analysenproben auch bei photometrischer Messung im UV-Bereich ausreichend hohe Extinktionen erbrachte, wurde in den vorliegenden Versuchen - v.a. wegen des erheblich geringeren Material- und Zeitaufwandes - die photometrische DNA-Bestimmung gewählt.

4.3. DDC-Wirkungen

4.3.1. Versuche zur semikonservativen DNA-Synthese (SDS)

4.3.1.1. In vitro-Wirkung von DDC auf den semikonservativen ³H-dT-Einbau

4.3.1.1.1. ³H-dT-Einbau in Abhängigkeit steigender DDC-Konzentrationen

4.3.1.1.1.1. Knochenmarkszellen

Zellsuspensionen mit 8×10^6 Knochenmarkszellen/ml wiesen gegenüber den Kontrollen kaum Unterschiede im ³H-dT-Einbau auf. Der Zusatz von 1 bis 1000 µg DDC/ml ließ erst bei der höchsten DDC-Konzentration eine Hemmung des Einbaues um 10 % erkennen (nicht eigens dargestellt).

Untersuchungen an Milzzellen hatten gezeigt, daß die DDC-Wirkung durch die Zellkonzentration beeinflusst werden kann (40). Es lag daher nahe, diesen Effekt auch bei Knochenmarkszellsuspensionen darzustellen (Abb.15). In der Tat ließ sich im Bereich niedriger Zellkonzentrationen eine Hemmung des ³H-dT-Einbaues mit biphasischer Dosiswirkungskurve erreichen. Bei einer Zelldichte von 4×10^6 /ml ergab sich in Gegenwart von 10 µg DDC/ml eine maximale (rund 70 %ige) Hemmung des ³H-dT-Einbaues, die nach Zugabe von 100 µg DDC/ml rückläufig war und bei 1000 µg DDC/ml erneut einsetzte. Weitere Verringerung der Zellkonzentration auf 2×10^6 bzw. 10^6 Zellen/ml bewirkte eine Linksverschiebung der Kurve mit 1. Hemmphase bei 1 µg DDC/ml bei in der Tendenz gleichbleibendem Kurvenverlauf. DDC-Konzentrationen $\leq 0,1$ µg/ml ließen keine eindeutige Wirkung auf den

Einbau erkennen, da sowohl geringe Stimulation als auch Hemmung auftraten. Die Standardabweichungen lagen im Bereich von 0 bis 6 %.

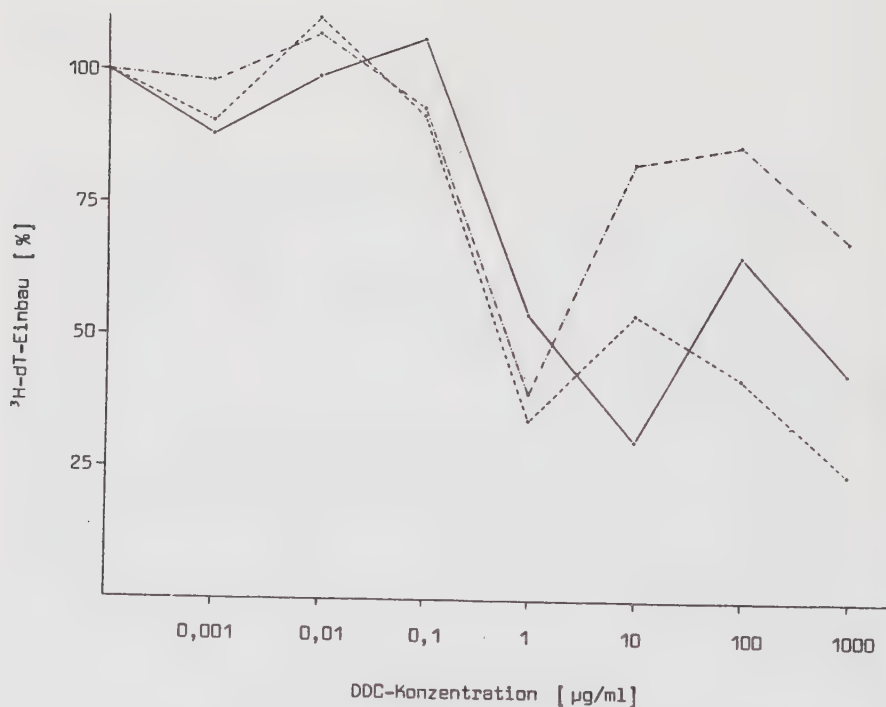


Abb.15: Knochenmarkszellen. DDC-Wirkung in vitro. Semikonserverter ³H-dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der DDC-Konzentration und der Zellzahl. n = 3.

— 4x10⁶ Zellen/ml
 - - - 2x10⁶ Zellen/ml
 . . . 10⁶ Zellen/ml

100 % = 7.463.411 ± 108.924 dpm/mg DNA.

4.3.1.1.1.2. Thymuszellen

DDC-Konzentrationen von 1 bis 1000 $\mu\text{g/ml}$ (entspricht nicht den freien Konzentrationen, siehe auch Methodik 3.3.3.1.2.) führten bei Thymuszellen bei einer Zelldichte von $8 \times 10^6/\text{ml}$ zu einer dosisabhängig zunehmenden Hemmung des ^3H -dT-Einbaues, während kleinere DDC-Konzentrationen keine eindeutigen Effekte zeigten (Abb.16).

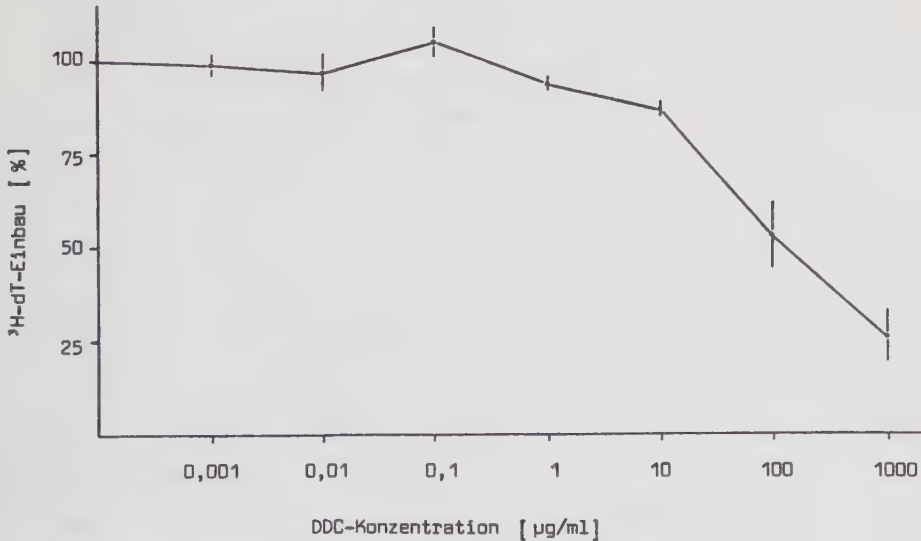


Abb.16: Thymuszellen. DDC-Wirkung in vitro. Semikonservativer ^3H -dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der DDC-Konzentration. 8×10^6 Zellen/ml. $n = 3$.
100 % = $7.414.254 \pm 52.028$ dpm/mg DNA.

Bei niedrigerer Zelldichte ($2 \times 10^6/\text{ml}$) wurden auch Thymuszellen mit steigenden DDC-Konzentrationen biphasisch beeinflusst (Abb.17). 10 μg DDC/ml hemmten den ^3H -dT-Einbau zu 98 - 99 %.

100 µg DDC/ml dagegen nur zu 94 %. Der absolute ^3H -dT-Einbau war bei 100 µg DDC/ml gegenüber 10 und 1000 µg DDC/ml um den Faktor 2 bis 3 erhöht. Im Unterschied zu Knochenmarkszellen fallen bei Thymuszellen der rasche Abfall des Tracer-Einbaues im Bereich von 0,1 bis 10 µg DDC/ml und die dem Umfang nach ausgeprägtere Hemmung auf (Abb.16 u. 17).

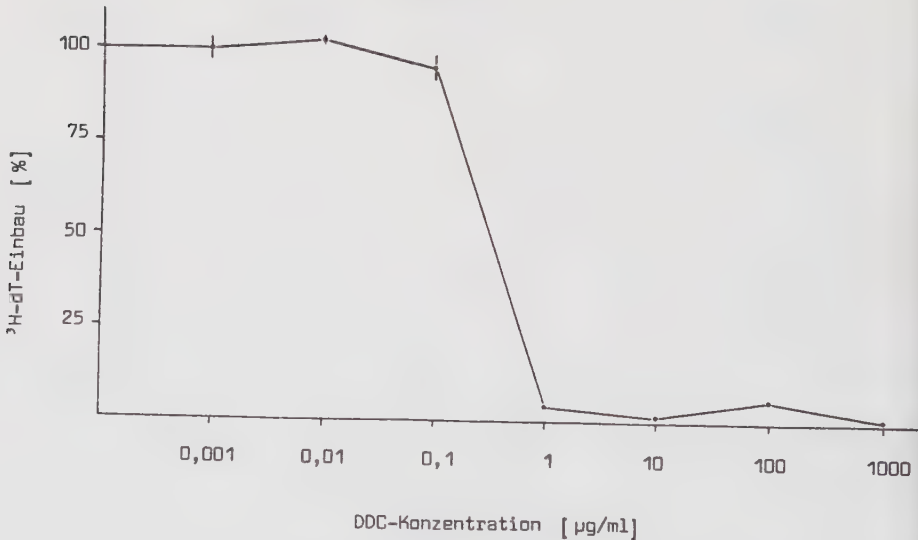


Abb.17: Thymuszellen. DDC-Wirkung in vitro. Semikonservativer ^3H -dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der DDC-Konzentration. 2×10^6 Zellen/ml. $n = 3$.

100 % = $8.485.312 \pm 207.942$ dpm/mg DNA.

4.3.1.2. In vivo-Wirkung von DDC auf den semikonservativen

^3H -dT-Einbau in vitro *

4.3.1.2.1. ^3H -dT-Einbau in Abhängigkeit von der DDC-Dosis

4.3.1.2.1.1. Knochenmarkszellen

Zum gewählten Aufarbeitungszeitpunkt führte die Applikation steigender DDC-Dosen zu einer dosisabhängigen Hemmung des semikonservativen ^3H -dT-Einbaues (Abb.18). Im höchsten Dosisbereich (≈ 500 mg DDC/kg) ergaben sich um 30 bis 40 % erniedrigte Einbauraten.

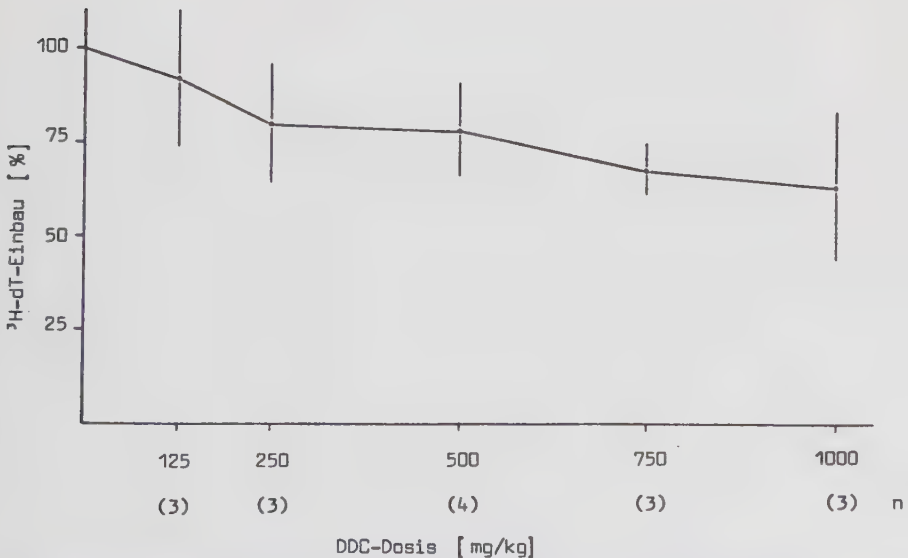


Abb.18: Knochenmarkszellen. DDC-Wirkung in vivo. Semikonservativer ^3H -dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der DDC-Applikation nach 1 h Überlebenszeit.

n = Anzahl der Tiere (2-3fach-Bestimmung je Tier)

* Numerische Mittelwerte der 100 %-Werte für die Abb. 18 - 21 siehe Tab.5, S.95.

4.3.1.2.1.2. Thymuszellen

Auch Thymuszellen reagierten auf DDC-Applikation in vivo mit einer dosisabhängigen Hemmung des semikonservativen ^3H -dT-Einbaues (Abb.19). Bei zunächst flachem Verlauf der Dosiswirkungskurve fiel der semikonservative ^3H -dT-Einbau bei höheren DDC-Dosen (≥ 500 mg/kg) rasch ab und erreichte bei 1000 mg/kg nur mehr 23 % der Kontrollwerte.

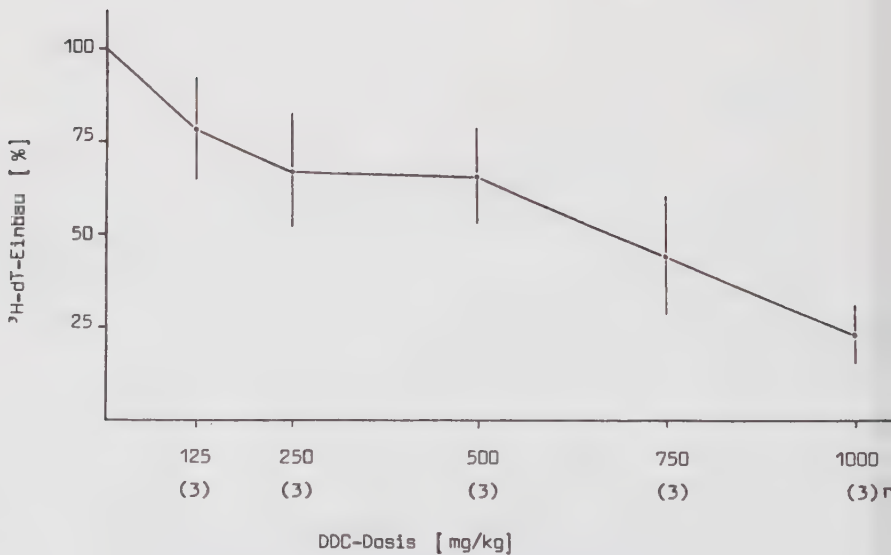


Abb.19: Thymuszellen. DDC-Wirkung in vivo. Semikonservativer ^3H -dT-Einbau in Abhängigkeit von der DDC-Applikation nach 1h Überlebenszeit.
n = Anzahl der Tiere (2-3fach-Bestimmung je Tier)

4.3.1.2.2. ^3H -dT-Einbau in Abhängigkeit von der Überlebenszeit nach DDC-Applikation

Um den Einfluß der Expositionszeit auf die SDS zu untersuchen, wurde eine DDC-Dosis von 1000 mg/kg gewählt. Diese Konzentration, die bei den untersuchten Zellsystemen nach einstündiger Überlebenszeit der Tiere den semikonservativen ^3H -dT-Einbau deutlich hemmen konnte, wurde verwendet, um auch eventuell geringe zeitabhängige DDC-Einflüsse zu erkennen.

4.3.1.2.2.1. Knochenmarkszellen

Mit zunehmender in vivo-Exposition zeigten Knochenmarkszellen ein eigenartig undulierendes Verhalten des semikonservativen ^3H -dT-Einbaues (Abb.20). Die stärkste Einbauhemmung konnte bei einstündiger Überlebenszeit erzielt werden. Dieser Effekt war nach 2 Stunden vollständig aufgehoben und trat nach 4 h - wenn auch in geringerem Umfang - wieder auf. Im folgenden Verlauf deutete sich eine Stimulation des ^3H -dT-Einbaues an; nach 24 h wurden wieder die Kontrollwerte erreicht.

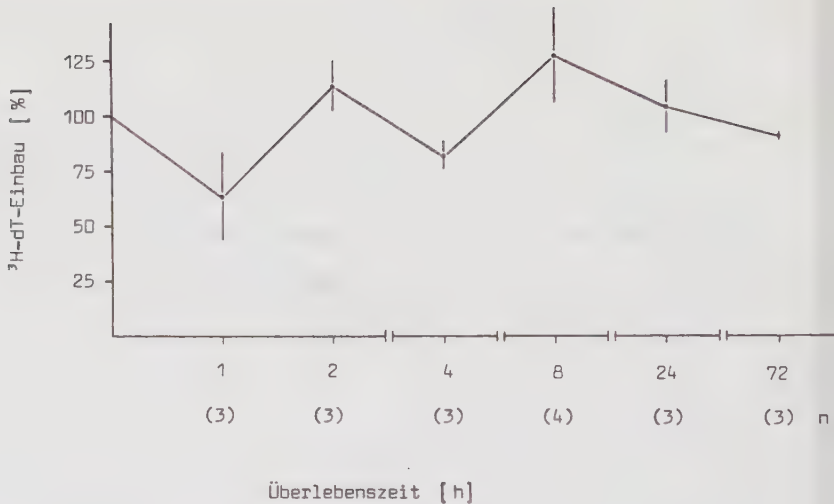


Abb.20: Knochenmarkszellen. DDC-Wirkung in vivo. Semikonserverativer $^3\text{H-dT}$ -Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der Überlebenszeit nach Applikation von 1000 mg DDC/kg i.p.

n = Anzahl der Tiere (2-3fach-Bestimmung je Tier)

4.3.1.2.2.2. Thymuszellen

Die intraperitoneale Applikation von 1000 mg DDC/kg ließ auch bei Thymuszellen nach 2stündiger Überlebenszeit der Tiere einen signifikanten Rückgang der $^3\text{H-dT}$ -Einbauhemmung erkennen (Abb.21). Nach 4 h erfolgte eine erneute Hemmphase, die zwar quantitativ unterschiedlich ausfiel, aber auch noch nach 72 h deutlich mit Werten, die etwa 50 % unter den Ein-

bauraten der Kontrolltiere lagen, ausgeprägt war.

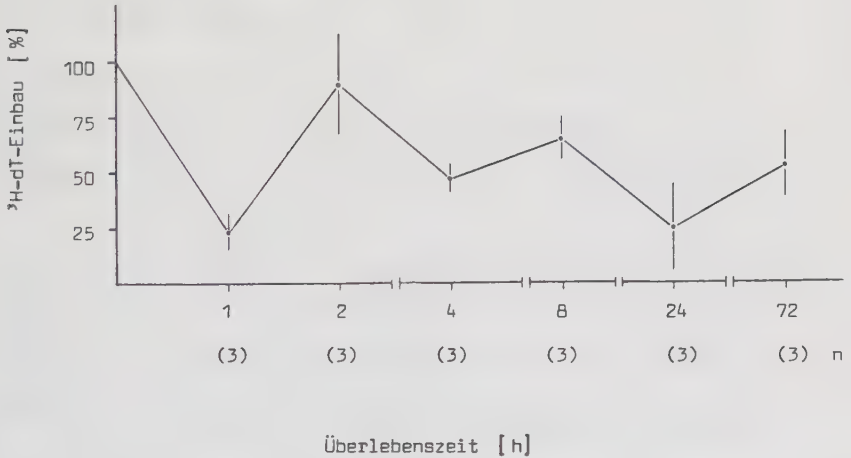


Abb.21: Thymuszellen. DDC-Wirkung in vivo. Semikonservativer $^3\text{H-dT}$ -Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der Überlebenszeit nach Applikation von 1000 mg DDC/kg i.p.
n = Anzahl der Tiere (2-3fach-Bestimmung je Tier)

4.3.1.3. In vivo-Markierung der DNA mit $^3\text{H-dT}$

Die intraperitoneale Applikation von $^3\text{H-dT}$ diente der Untersuchung des semikonservativen in vivo-Einbaues des Tracers in die DNA (Abb.22). In Anbetracht der erforderlichen hohen Aktivitäten konnten nur orientierende Aussagen gewonnen werden. Jede dargestellte DDC-Dosis wurde nur an einem Tier mit

3 Parallelansätzen untersucht. Die Kontrollwerte wurden mit 3 Tieren erstellt. Eine Stunde nach DDC-Verabreichung wurde den Ratten $^3\text{H-dT}$ i.p. appliziert. Nach einer weiteren Stunde wurden die Tiere dekapitiert und die Zellsuspension gewonnen. Der semikonservative in vivo-Einbau des $^3\text{H-dT}$ wurde bei Knochenmarkszellen durch niedrige DDC-Dosen (125 und 250 mg/kg) nur geringfügig beeinträchtigt. Höhere Dosen (500 und 1000 mg/kg) bewirkten eine zunehmende Hemmung von 57 bzw. 75 %. Thymuszellen zeigten bei 125 mg DDC/kg eine geringe Stimulation des $^3\text{H-dT}$ -Einbaues, während höhere DDC-Dosen zu einer dosisabhängig zunehmenden Hemmung von maximal 85 % führten. Die absolute semikonservative DNA-Syntheseleistung divergierte bei den einzelnen Zellsystemen erheblich. So lag der $^3\text{H-dT}$ -Einbau von Knochenmarkszellen um den Faktor 5 bis 6 höher als bei Thymuszellen; die Standardabweichungen betrugen ≤ 5 %.

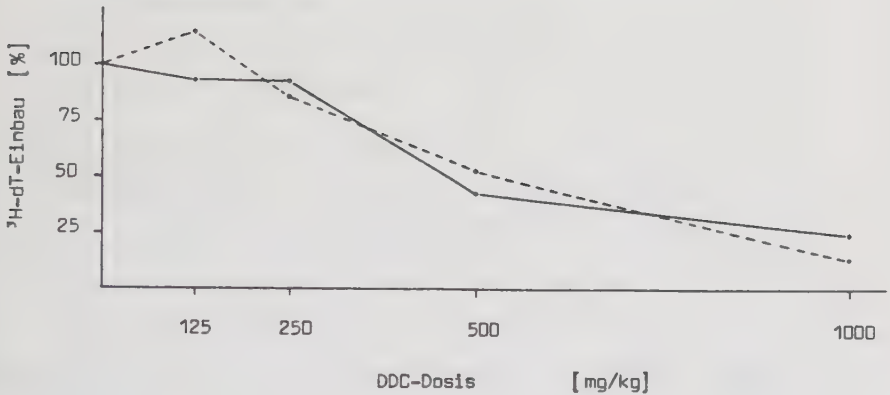


Abb.22: Knochenmarks- und Thymuszellen. DDC-Wirkung in vivo. Semikonservativer in vivo- ^3H -dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der DDC-Dosis.
 ^3H -dT-Konzentration: 1 μCi (37 KBq) pro g Körpergewicht.
 ^3H -dT-Applikation: 1 h nach einer DDC-Wirkzeit von 1 h.
3fach-Bestimmung je DDC-Dosis.
— Knochenmarkszellen (100 % = 55.049 ± 2.606 dpm/mg DNA)
---- Thymuszellen (100 % = 9.711 ± 483 dpm/mg DNA)

4.3.2. Gewichte von Thymus und Milz nach DDC-Applikation

Bei der Herstellung der Thymuszellsuspension zur Untersuchung der zeitabhängigen DDC-Wirkung konnte eine auffällige Verkleinerung und Zellverarmung des Organes festgestellt werden. Daher wurde nachfolgend der Einfluß von 1000 mg DDC/kg auf das Gesamtgewicht des Thymus zeitabhängig ermittelt. Anhand der Milzgewichte wurde untersucht, ob sich dieser DDC-

Effekt auch auf andere lymphatische Organe erstreckt (Abb.23). Bereits 24 h nach DDC-Applikation war das Gesamtgewicht des Thymus um 21 % reduziert und betrug nach 3 Tagen nur mehr 50 % gegenüber den Kontrollorganen unbehandelter Tiere. Nach 7 Tagen war dieser Effekt rückläufig und konnte nach 24 Tagen nicht mehr nachgewiesen werden. Dagegen blieben die Naßgewichte der Milz durch DDC-Behandlung weitgehend unbeeinflusst.

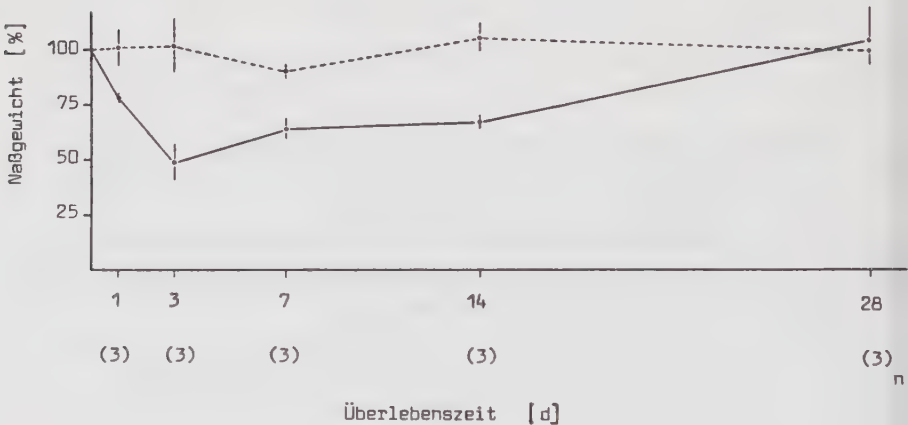


Abb.23: Naßgewicht von Thymus und Milz von Ratten in Abhängigkeit von der Überlebenszeit nach Applikation von 1000 mg DDC/kg i.p. n = Anzahl der Organe.

— Thymus
----- Milz

4.3.3. Versuche zur unprogrammierten DNA-Synthese (UDS)

4.3.3.1. In vitro-Wirkung von DDC auf den unprogrammierten ³H-dT-Einbau

4.3.3.1.1. Knochenmarkszellen

Knochenmarkszellen wiesen im Bereich von 0,1 bis 10 µg DDC/ml eine zunehmende Hemmung sowohl des durch UV-Licht stimulierten als auch des unstimulierten unprogrammierten ³H-dT-Einbaues in die DNA auf (Abb.24). Bei einer DDC-Konzentration von 100 µg/ml deutete sich ein leichter Rückgang des Hemmeffektes an, der jedoch auch in Wiederholungsanalysen mit 10 und 100 µg DDC/ml - bei gleicher Tendenz und quantitativen Unterschieden des Hemmeffektes - nicht eindeutig zu sichern war (Tab.3).

Der durch UV-Exposition induzierte Anteil der UDS konnte für alle untersuchten DDC-Konzentrationen nachgewiesen werden und betrug zwischen 31 und 95 %.

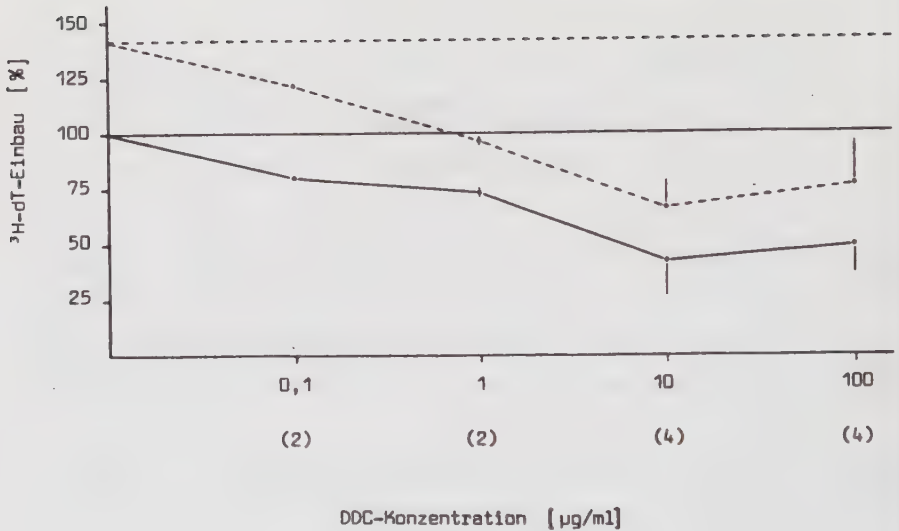


Abb.24: Knochenmarkszellen. DDC-Wirkung in vitro. Unprogrammierter ^3H -dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der DDC-Konzentration.

—— unstimulierte UDS

----- UV-stimulierte UDS

n = Anzahl der Ansätze

100 % = 569.190 ± 57.380 dpm/mg DNA.

	UDS		UDS + UV	
	10 µg DDC/ml	100 µg DDC/ml	10 µg DDC/ml	100 µg DDC/ml
Analyse 1	69,61 ± 0,52	60,64 ± 1,03	61,35 ± 2,90	59,87 ± 6,05
Analyse 2	45,17 ± 2,29	41,03 ± 2,64	44,33 ± 0,99	32,30 ± 1,34

Tab. 3: Knochenmarkszellen. DDC-Wirkung in vitro.
 Prozentuale Hemmung des unprogrammierten
³H-dT-Einbaues in die DNA. n = 2.

4.3.3.1.2. Thymuszellen

Der stimulierte und unstimulierte unprogrammierte ^3H -dT-Einbau wurde durch DDC-Konzentrationen von 0,1 bis 100 $\mu\text{g/ml}$ gehemmt. Analog den Untersuchungen an Knochenmarkszellen wiesen auch Thymozyten bei einer Dosis von 100 μg DDC/ml einen Anstieg der Einbauraten gegenüber 10 μg DDC/ml auf (Abb.25).

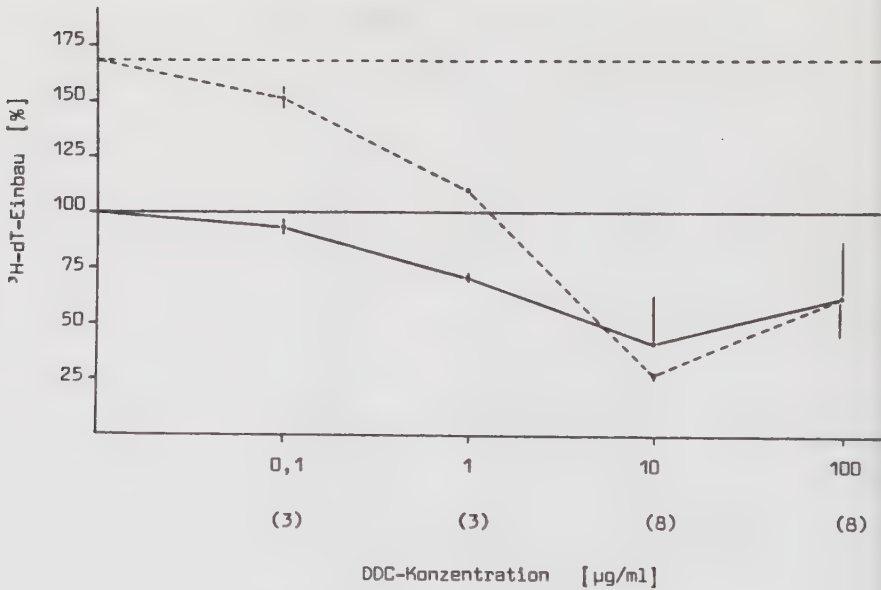


Abb.25: Thymuszellen. DDC-Wirkung in vitro. Unprogrammierter ^3H -dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der DDC-Konzentration.

— unstimulierte UDS
----- UV-stimulierte UDS

n = Anzahl der Ansätze

100 % = 70.515 ± 1.577 dpm/mg DNA.

Auch hier führten weitere Analysen mit 10 und 100 µg DDC/ml zu quantitativ unterschiedlichen Hemmeffekten (Tab.4). Im Unterschied zu Knochenmarkszellen konnte bei 10 und 100 µg DDC/ml keine UV-Stimulation des unprogrammierten ³H-dT-Einbaues mehr erzielt werden. Die Behandlung der Thymuszellsuspensionen mit 10 µg DDC/ml bewirkte ein Absinken der UV-stimulierten ³H-dT-Einbauraten unter die Werte der unstimulierten Proben gleicher DDC-Konzentration, was einer Potenzierung der DDC-Wirkung durch UV-Exposition gleichkommt.

	UDS			UDS + UV	
	10 µg DDC/ml	100 µg DDC/ml	10 µg DDC/ml	100 µg DDC/ml	
Analyse 1	68,59 ± 1,03	63,25 ± 1,06	80,77 ± 1,26	81,94 ± 0,31	
Analyse 2	74,42 ± 1,49	35,86 ± 2,87	85,43 ± 0,58	57,25 ± 0,45	
Analyse 3	33,37 ± 0,81	13,61 ± 5,46	85,00 ± 2,50	48,11 ± 3,30	

Tab. 4: Thymuszellen. DDC-Wirkung in vitro.
Prozentuale Hemmung des unprogrammier-
ten ³H-dT-Einbaues in die DNA. n = 2-3.

4.3.3.2. In vivo-Wirkung von DDC auf den unprogrammierten
³H-dT-Einbau in vitro *

4.3.3.2.1. ³H-dT-Einbau in Abhängigkeit von der DDC-Dosis

4.3.3.2.1.1. Knochenmarkszellen

Gegenüber unbehandelten Kontrolltieren konnte sowohl der unstimulierte als auch der stimulierte unprogrammierte ³H-dT-Einbau durch niedrige DDC-Dosen nach einer Stunde Überlebenszeit der Tiere nicht signifikant stimuliert und durch hohe DDC-Dosen gehemmt werden (Abb.26).

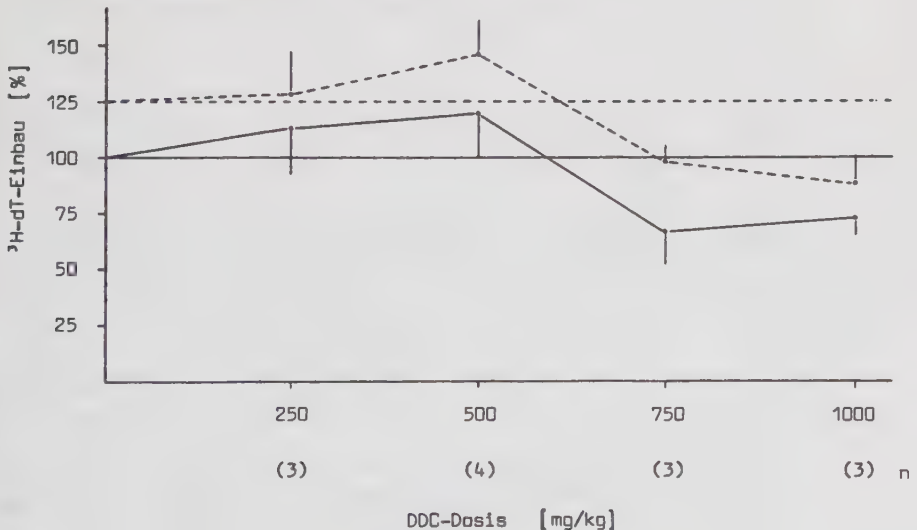


Abb.26: Knochenmarkszellen. DDC-Wirkung in vivo. Unprogrammierter ³H-dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der DDC-Applikation nach 1 h Überlebenszeit.

UV-Dosis: $32 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$.

n = Anzahl der Tiere (2-3fach-Bestimmung je Tier)

— unstimulierte UDS

---- UV-stimulierte UDS

4.3.3.2.1.2. Thymuszellen

DDC-Applikationen von 250 bis 1000 mg/kg i.p. hatten eine zunehmende Reduzierung des unstimulierten und stimulierten unprogrammierten ^3H -dT-Einbaues zur Folge (Abb.27). Eine DDC-Dosis von 125 mg/kg führte zu erhöhten Einbauraten, die jedoch außerordentlich hohen Schwankungen unterworfen und nicht signifikant waren. Eine scheinbare Abnahme des UV-spezifischen Anteiles des unprogrammierten ^3H -dT-Einbaues in höheren DDC-Konzentrationen war statistisch nicht signifikant.

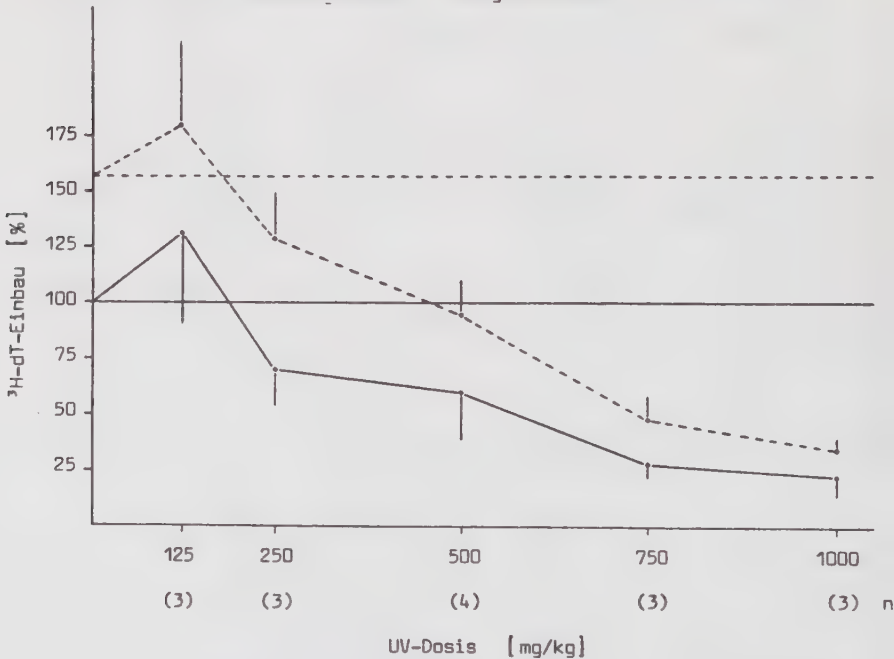


Abb.27: Thymuszellen. DDC-Wirkung in vivo. Unprogrammierter ^3H -dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der DDC-Applikation nach 1 h Überlebenszeit. UV-Dosis: $64 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$.
n = Anzahl der Tiere (2-3fach-Bestimmung je Tier)
—— unstimulierte UDS
----- UV-stimulierte UDS

4.3.3.2.2. ^3H -dT-Einbau in Abhängigkeit von der Überlebenszeit nach DDC-Applikation

4.3.3.2.2.1. Knochenmarkszellen

Auch für die zeitabhängig durchgeführten Versuche zur UDS wurde eine DDC-Applikation von 1000 mg/kg gewählt. Die unprogrammierten ^3H -dT-Einbauraten der Knochenmarkszellen waren bei 1- bis 4stündiger Überlebenszeit der Tiere zwischen 10 und 30 % gehemmt (Abb.28). Nach 8 h zeigte sich jedoch - wie bei der semikonservativen DNA-Synthese (Abb.20) - eine deutliche Zunahme des unprogrammierten ^3H -dT-Einbaues gegenüber den Werten der scheinbehandelten Tiere.

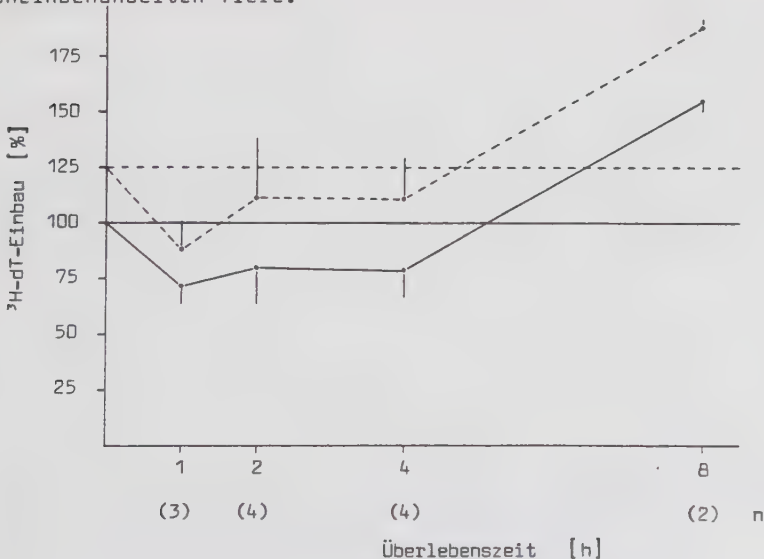


Abb.28: Knochenmarkszellen. DDC-Wirkung in vivo. Unprogrammierter ^3H -dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der Überlebenszeit nach Applikation von 1000 mg DDC/kg i.p. UV-Dosis: $32 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$.

n = Anzahl der Tiere (2-3fach-Bestimmung je Tier)

— unstimulierte UDS

- - - UV-stimulierte UDS

4.3.3.2.2.2. Thymuszellen

Versuche zum Einfluß der DDC-Expositionszeit ließen für die UDS der Thymuszellen im Unterschied zu den Knochenmarkszellen einen biphasischen Verlauf erkennen (Abb.29). Wie der replikative ^3H -dT-Einbau war auch der unprogrammierte Einbau durch zwei Hemmphasen gekennzeichnet, die durch einen weitgehenden Rückgang der Hemmung nach 2 h unterbrochen wurden.

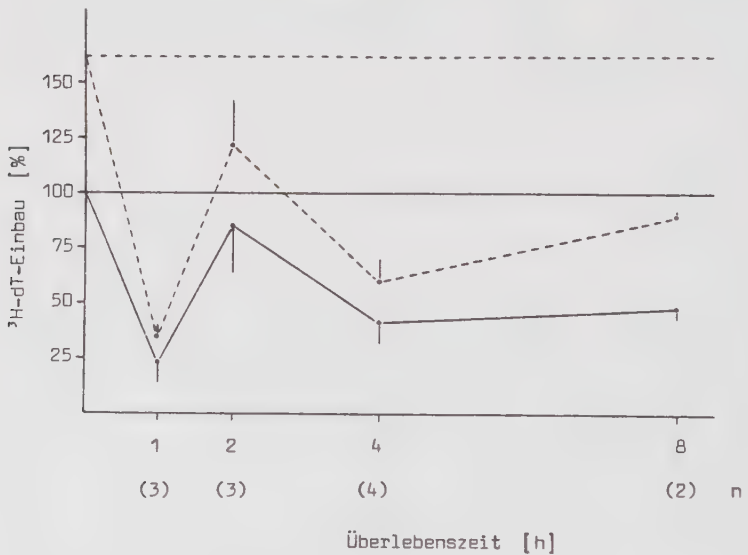


Abb.29: Thymuszellen. DDC-Wirkung in vivo. Unprogrammierter ^3H -dT-Einbau in die DNA in Abhängigkeit von der Überlebenszeit nach Applikation von 1000 mg DDC/kg i.p. UV-Dosis: $64 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$.

n = Anzahl der Tiere (2-3fach-Bestimmung je Tier)

— unstimulierte UDS

----- UV-stimulierte UDS

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß - bei etwa 180 untersuchten Einzelansätzen - der UV-stimulierte Anteil des unprogrammierten ³H-dT-Einbaues durch keine der in vivo applizierten DDC-Dosen signifikant beeinträchtigt werden konnte. Auch unterschiedliche Expositionszeiten (1000 mg DDC/kg) hatten bei den untersuchten Zellsystemen keine Beeinflussung der spezifischen UV-Stimulation zur Folge (Abb.26-29).

Der prozentuale UV-induzierte Anteil der UDS gegenüber den unbestrahlten Werten der Kontrolltiere bzw. gegenüber den unbestrahlten Werten der mit gleicher DDC-Dosis behandelten Tiere war in den vorliegenden Versuchen nicht eindeutig quantifizierbar. Die UV-Stimulation der Thymozyten lag zwischen 23 und 123 %, die der Knochenmarkszellen zwischen 7 und 67 %, unabhängig von der DDC-Applikation. Abb.30 zeigt den mittleren UV-stimulierten Anteil der UDS der Kontrolltiere und der DDC-behandelten Tiere von Thymus- und Knochenmarkszellen.

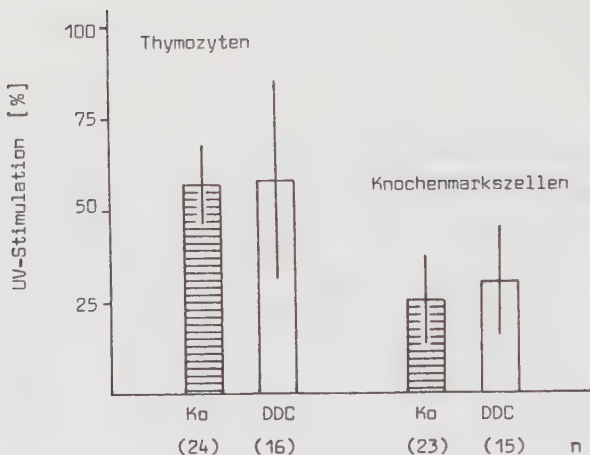


Abb.30: Knochenmarkszellen, Thymuszellen. DDC-Wirkung in vivo.
Prozentualer UV-induzierter Anteil der UDS der Kontrolltiere und DDC-behandelter Tiere.

UV-Dosis: Knochenmarkszellen: $32 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$.

Thymuszellen: $64 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$.

n = Anzahl der Tiere (2-3fach-Bestimmung je Tier)

4.3.4. Vergleich der ^3H -dT-Einbaureaten von Knochenmarks- und Thymuszellen

Tab.5 zeigt eine Zusammenfassung der absoluten ^3H -dT-Einbaureaten in die DNA der SDS und unstimulierten UDS von Knochenmarks- und Thymuszellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aller

Tageskontrollen der Versuche zur in vivo-Wirkung von DDC.

	SDS	UDS
Knochen- markszel- len	7.377 $\pm$ 1.265 n = 13	765 $\pm$ 185 n = 15
Thymus- zellen	7.857 $\pm$ 1.622 n = 15	95 $\pm$ 20 n = 16

Tab. 5: Absolute semikonservative und unstimulierte unpro-
grammierte ^3H -dT-Einbausraten von Knochenmarks- und
Thymuszellen; $\text{dpm} \times 10^3 \times \text{mg}^{-1} \text{ DNA}$.
n = Anzahl der Tiere (2-3fach-Bestimmung je Tier)

Bei etwa gleicher semikonservativer DNA-Syntheseleistung wiesen die beiden Zellsysteme Unterschiede in der unstimulierten unprogrammierten DNA-Synthese auf. Die in Gegenwart von HU gemessenen ^3H -dT-Einbausraten der Knochenmarkszellen waren hierbei um den Faktor 8 gegenüber Thymuszellen erhöht. Die durchschnittliche UV-Stimulation der Thymuszellen (UV-Dosis: $64 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$) betrug 57 %, die der Knochenmarkszellen (UV-Dosis: $32 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$) 25 % (Abb.30).

4.3.5. Versuche zur RNA-Synthese

Der Einfluß von 1000 mg DDC/kg führte bei den untersuchten Zellsystemen zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich der ^{14}C -U-Einbauraten als Ausdruck der RNA-Synthese (Abb.31). Nach 1 h Überlebenszeit der Tiere zeigten Knochenmarkszellen einen nahezu unveränderten ^{14}C -U-Einbau, während die ^{14}C -Markierungsrate von Thymuszellen leicht stimuliert war. Wurde 24 h nach DDC-Gabe untersucht, deutete sich bei Knochenmarkszellen eine Stimulation an, die jedoch hohen Schwankungen unterlag. Die ^{14}C -Einbaurate der Thymuszellen war demgegenüber nach 24 h deutlich gehemmt (53 %).

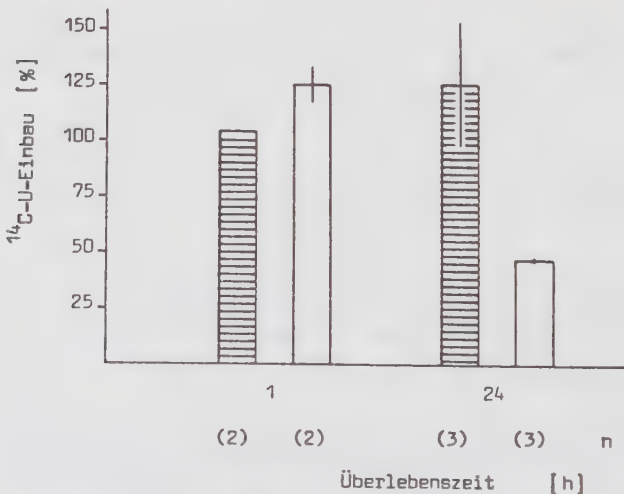


Abb.31: Knochenmarkszellen, Thymuszellen. DDC-Wirkung in vivo. ^{14}C -U-Einbau in die RNA in Abhängigkeit von der Überlebenszeit nach Applikation von 1000 mg DDC/kg i.p.

schraffierte Säulen = Knochenmarkszellen

(100 % = 847 ± 12 dpm/ 10^6 Zellen)

helle Säulen

= Thymuszellen

(100 % = 896 ± 57 dpm/ 10^6 Zellen)

n = Anzahl der Tiere (3fach-Bestimmung je Tier)

Anhand der nachfolgenden Analysen wurden verschiedene Faktoren untersucht, die einen Einfluß auf den veränderten ^3H -dT-Einbau in die DNA nach DDC-Behandlung ausüben können. Als Versuchsmodell dienten Thymuszellen 1 h nach i.p.-Applikation von 1000 mg DDC/kg KG.

4.3.6. Isotopenverdünnungs-Analysen

4.3.6.1. In vitro-Wirkung von DDC auf den endogenen Thymidinpool

Wurden Thymuszellen in Gegenwart von 100 µg DDC/ml vorinkubiert, konnte - bei gleichzeitiger SDS-Hemmung von 78 % - kein signifikanter Unterschied des Kurvenverlaufes gegenüber den Kontrollwerten erzielt werden (Abb.32). 50 %ige Hemmung des ^3H -dT-Einbaues wurde durch 3 µg dT/ml erreicht. Da dies dem Wert der Kontrollkurve entsprach, war in vitro kein Einfluß von DDC auf den endogenen Thymidinpool der Thymuszellen nachzuweisen.

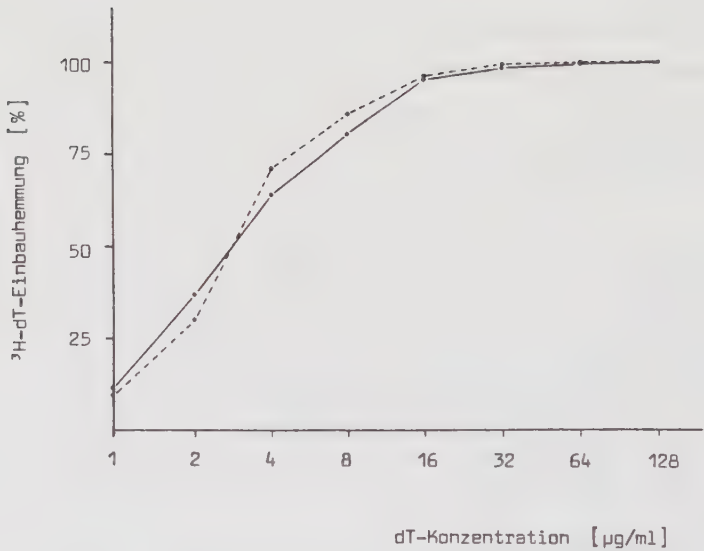


Abb.32: Thymuszellen. DDC-Wirkung in vitro. Prozentuale Hemmung des semikonservativen ^3H -dT-Einbaues in die DNA durch unmarkiertes Thymidin, konzentrationsabhängig.

— unbehandelte Kontrollproben; $n = 6$

---- DDC-behandelte Proben: 100 µg DDC/ml (0,44 mmol/l); $n = 3$

1 µg dT/ml = 4,1 µmol dT/l.

4.3.6.2. In vivo-Wirkung von DDC auf den endogenen Thymidin- pool

Der Einfluß von 1000 mg DDC/kg auf die durch unmarkiertes Thymidin verminderten ^3H -dT-Einbauraten wurde nach 1, 2 und 24 h Überlebenszeit der Tiere an Thymuszellen untersucht. Dabei zeigten die Kurven der DDC-behandelten Tiere gegenüber den Kontrollen einen flacheren Verlauf (Abb.33). Mit einer DE_{50} von etwa 8 $\mu\text{g dT/ml}$ war dieser Effekt nach 1 h DDC-Exposition am deutlichsten ausgeprägt. Mit zunehmender DDC-Wirkungsdauer verminderte sich zwar die DE_{50} , bei höheren dT-Konzentrationen ließ jedoch die Kurve des 24 h-Wertes eine niedrigere Einbauhemmung des Tracers erkennen. 50 %ige ^3H -dT-Einbauhemmung durch dT wurde durch die folgenden Konzentrationen nach Applikation von 1000 mg DDC/kg erreicht:

1 h Überlebenszeit: 8 $\mu\text{g dT/ml}$

2 h Überlebenszeit: 6 $\mu\text{g dT/ml}$

24 h Überlebenszeit: 4,5 $\mu\text{g dT/ml}$

Kontrolle: 3 $\mu\text{g dT/ml}$

Somit konnte auf eine Expansion des endogenen Thymidinpools der Thymuszellen durch in vivo-Behandlung mit DDC geschlossen werden (s.auch 3.3.6.), wobei sich Unterschiede in der zeitabhängigen Wirkung ergaben. Die Standardabweichungen betrugen zwischen 0 und 6 %.

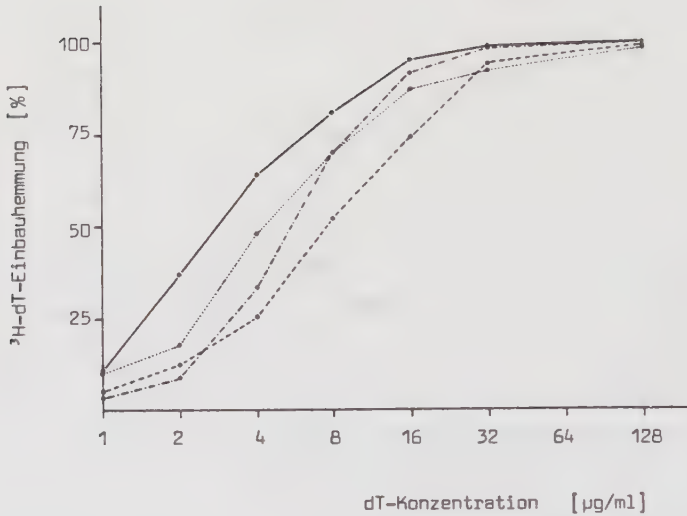


Abb.33: Thymuszellen. DDC-Wirkung in vivo. Prozentuale Hemmung des semikonservativen ^3H -dT-Einbaues in die DNA durch unmarkiertes Thymidin, konzentrationsabhängig nach Applikation von 1000 mg DDC/kg i.p. und unterschiedlichen Überlebenszeiten.

———— Kontrolltiere; n = 6
----- 1 h Überlebenszeit; n = 6
-.-.-.- 2 h Überlebenszeit; n = 3
..... 24 h Überlebenszeit; n = 3

1 µg dT/ml = 4,1 µmol dT/l

4.3.7. Nucleoidsedimentation

Das Sedimentationsverhalten von Nucleoiden wurde an Thymuszellen untersucht.

4.3.7.1. In vivo-Wirkung von DDC auf die Nucleoidsedimentation

Die Applikation von 1000 mg DDC/kg zeigte keinen eindeutigen Einfluß auf die Sedimentationsstrecke des DNA-Ethidiumbromid-komplexes (Abb.34). Nach einer Überlebenszeit von 1 und 4 h deutete sich eine geringgradig beschleunigte Sedimentation an, während die 2 h-Werte gegenüber den Kontrollen leicht zurückblieben. Die Werte waren statistisch nicht signifikant.

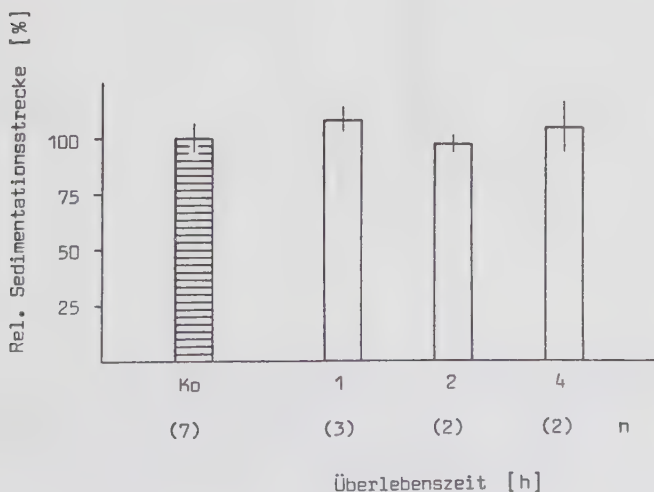


Abb.34: Thymuszellen. DDC-Wirkung in vivo. Sedimentation von Thymusnucleoiden in Abhängigkeit von der Überlebenszeit nach Applikation von 1000 mg DDC/kg i.p.
n = Anzahl der Tiere (3fach-Bestimmung je Tier)

4.3.7.2. In vivo-Wirkung von DDC auf die Nucleoidsedimentation nach Ganzkörper-röntgenbestrahlung

Eine einmalige DDC-Injektion (1000 mg/kg) 1 h vor Ganzkörper-röntgenbestrahlung mit einer Energiedosis von 8 Gy führte zu einer geringen (5 %) - jedoch statistisch signifikanten - Beschleunigung der Nucleoidsedimentation. Form und Fluoreszenz des DNA-Ethidiumbromid-Komplexes blieben unverändert (Abb.35).

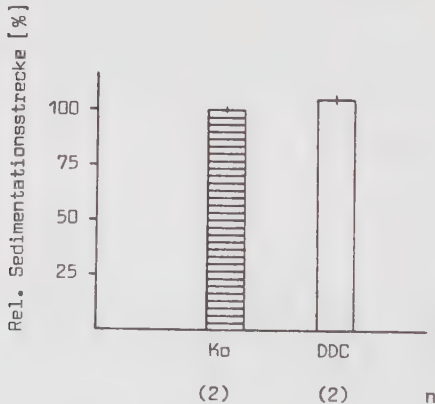


Abb.35: Thymuszellen. DDC-Wirkung in vivo. Sedimentation von Thymusnucleoiden nach Ganzkörper-röntgenbestrahlung (8 Gy) 1 h nach Applikation von 1000 mg DDC/kg i.p. n = Anzahl der Tiere (3fach-Bestimmung je Tier)

4.3.8. Intrazelluläre ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metaboliten-Konzentration und ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metaboliten-Rücktransport

4.3.8.1. Unprogrammierte DNA-Synthese

Für die in Abb.36 und 37 dargestellten Untersuchungen wurden eine DDC-Applikation von 1000 mg/kg i.p. und eine Überlebenszeit der Tiere von 1 h gewählt. Zur Hemmung der replikativen DNA-Synthese wurden die Thymuszellen mit einem HU-Zusatz von 10^{-2} mol/l zur Hanks-Lösung vorinkubiert.

Unmittelbar nach DDC-Behandlung war die intrazelluläre ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metaboliten-Konzentration um etwa 70 % reduziert; sie verringerte sich anschließend wie die Kontrollkonzentrationen innerhalb 30 min kontinuierlich (Abb.36). Nachdem kein weiteres extrazelluläres ^3H -dT angeboten wurde, erfolgte während der untersuchten Zeit eine stetig ansteigende Evasion des intrazellulär aufgenommenen Tracers. Der absolute ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metaboliten-Rücktransport der DDC-beeinflußten Zellen war gegenüber den Kontrollen um durchschnittlich 33 % erniedrigt, führte jedoch nach 25 min zu einer höheren extra- als intrazellulären ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metaboliten-Konzentration (Abb.36 und 37).

Der unprogrammierte ^3H -dT-Einbau in die DNA der Thymuszellen DDC-behandelter Tiere wurde nach 30 min Inkubation mit ^3H -dT um 65 % gehemmt. Nach Wechsel des Mediums und weiterer 30 min Inkubation, zu der kein ^3H -dT extrazellulär zugesetzt wurde, wiesen die Proben beider Analysenreihen keine signifikante Steigerung der ^3H -dT-Einbauraten auf (Abb.36).

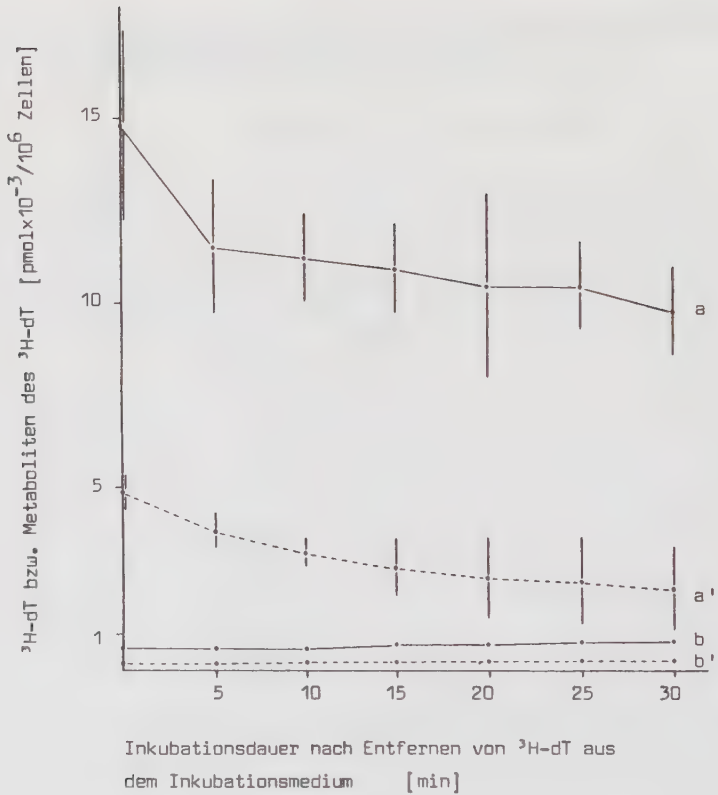


Abb.36: Thymuszellen; DDC-Wirkung in vivo. Unprogrammierte DNA-Synthese. Intrazelluläre $^3\text{H-dT}$ - bzw. $^3\text{H-dT}$ -Metaboliten-Konzentration (a,a') und $^3\text{H-dT}$ -Einbau in die DNA (b,b') in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer nach Entfernen des Tracers aus dem Inkubationsmedium. Vorbehandlung der Tiere mit 1000 mg DDC/kg i.p., 1 h Überlebenszeit.

— Kontrolle
---- DDC

Anzahl der Tiere = 3 (2fach-Bestimmung je Wert)

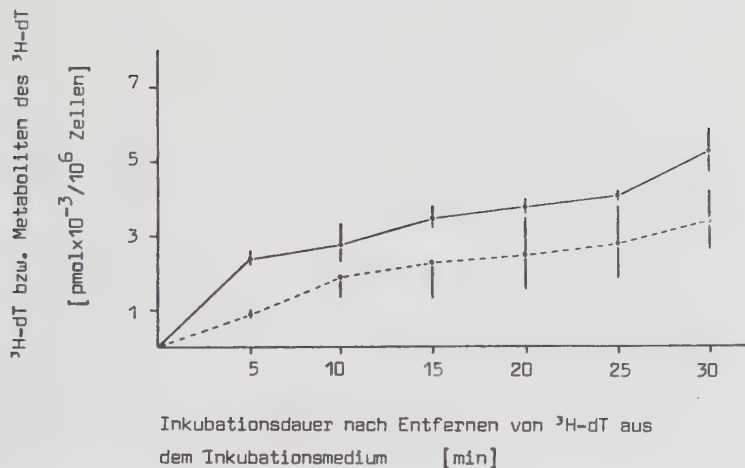


Abb.37: Thymuszellen; DDC-Wirkung in vivo. Unprogrammierte DNA-Synthese. Extrazelluläre ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metaboliten-Konzentration in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer nach Entfernen des Tracers aus dem Inkubationsmedium. Vorbehandlung der Tiere mit 1000 mg DDC/kg i.p., 1 h Überlebenszeit.

— Kontrolle

---- DDC

Anzahl der Tiere = 3 (2fach-Bestimmung je Wert)

4.3.8.2. Semikonservative DNA-Synthese

Eine vergleichende Analyse zu den oben dargestellten Ergebnissen wurde auch bei ungehemmter semikonservativer DNA-Synthese durchgeführt (Abb.38 und 39). Sowohl die intra- als auch extrazellulären ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metaboliten-Konzentrationen führten zu tendenziell gleichem Verlauf wie die Konzentrationen bei der durch HU gehemmten replikativen DNA-Synthese. Die intrazelluläre ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metaboliten-Konzentration DDC-behandelter Tiere war um 30 % erniedrigt; der Rücktransport aus dem Zellularraum fiel entsprechend geringer aus. Nach Entfernen des Tracers aus dem Inkubationsmedium erfolgte auch bei ungehemmter replikativer DNA-Synthese keine weitere Steigerung des ^3H -dT-Einbaues in die DNA. Die DDC-Zellansätze zeigten eine um 70 bis 80 % reduzierte ^3H -dT-Einbaurate (Abb.38).

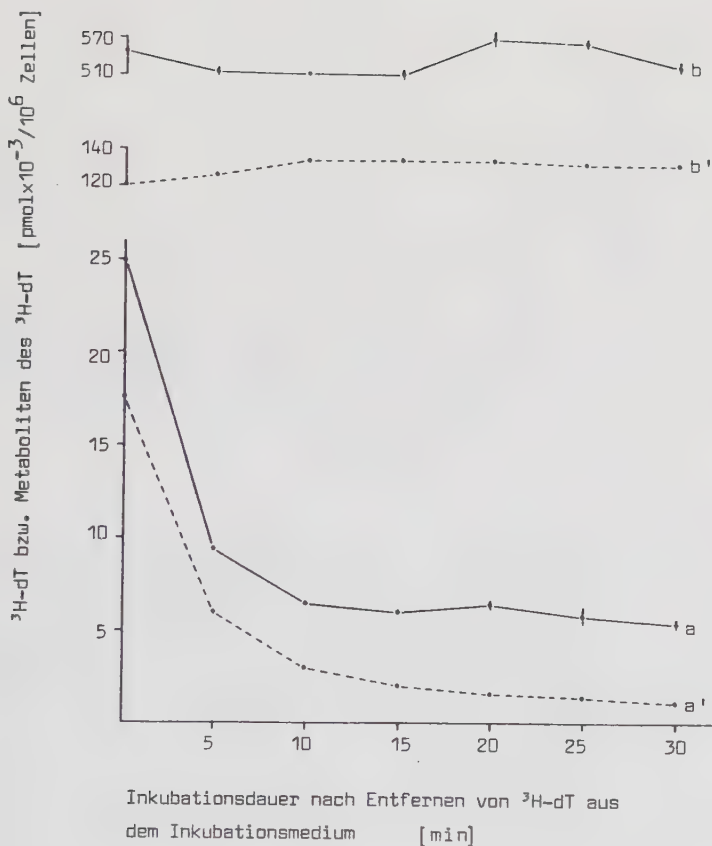


Abb. 38: Thymuszellen. DDC-Wirkung in vivo. Semikonservative DNA-Synthese. Intrazelluläre $^3\text{H-dT}$ - bzw. $^3\text{H-dT}$ -Metaboliten-Konzentration (a, a') und $^3\text{H-dT}$ -Einbau in die DNA (b, b') in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer nach Entfernen des Tracers aus dem Inkubationsmedium. Vorbehandlung des Tieres mit 1000 mg DDC/kg i.p., 1 h Überlebenszeit.

— Kontrolle

- - - - DDC

Anzahl der Tiere = 1 (2fach-Bestimmung je Wert)

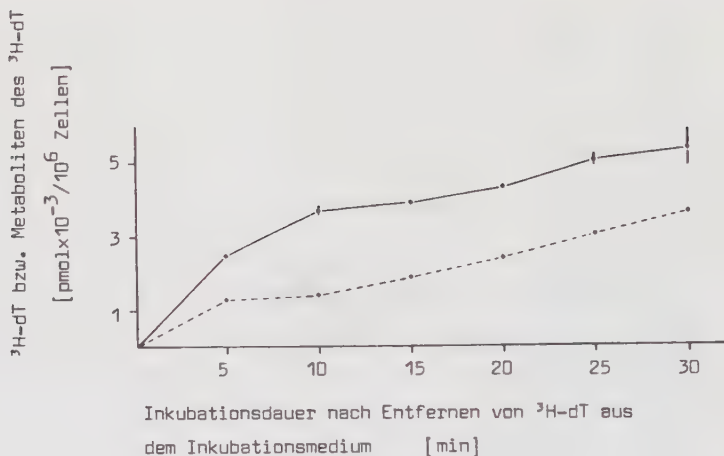


Abb.39: Thymuszellen; DDC-Wirkung in vivo. Semikonservative DNA-Synthese. Extrazelluläre ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metaboliten-Konzentration in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer nach Entfernen des Tracers aus dem Inkubationsmedium. Vorbehandlung des Tieres mit 1000 mg DDC/kg i.p., 1 h Überlebenszeit.

—— Kontrolle

----- DDC

Anzahl der Tiere = 1 (2fach-Bestimmung je Wert)

Im Vergleich zur unprogrammierten DNA-Synthese waren die intrazellulären ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metaboliten-Konzentrationen bei ungehemmter replikativer DNA-Synthese um den Faktor 1,7 (Kontrolle) bzw. 3,6 (DDC), der ^3H -dT-Einbau in die DNA jedoch um den Faktor 800 (Kontrolle) bzw. 500 (DDC) erhöht (Tab.6).

Bei unprogrammierter DNA-Synthese korrelierten die intrazellulären ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metaboliten-Konzentrationen mit den Einbauraten des Tracers in die DNA: 4,4 % (Kontrolle) bzw. 4,7 % (DDC) des intrazellulär aufgenommenen ^3H -dT wurden in die DNA eingebaut. Wesentlich höhere DNA-Einbauraten (SDS) wiesen jedoch keine entsprechend höheren intrazellulären ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metaboliten-Konzentrationen auf (Tab.6).

In beiden Analysenreihen (SDS und UDS) wurde ^3H -dT mit gleicher radioaktiver Konzentration (185 KBq) zugesetzt.

	intrazelluläre ^3H -dT- bzw. ^3H -dT- Metaboliten-Konz.	^3H -dT-Einbau in die DNA
UDS - DDC	4,85 $\pm$ 0,47	0,23 $\pm$ 0
UDS - Ko	14,82 $\pm$ 2,66	0,65 $\pm$ 0,03
SDS - DDC	17,59 $\pm$ 0,08	120,80 $\pm$ 9,20
SDS - Ko	25,01 $\pm$ 0,08	550,60 $\pm$ 8,40

Tab. 6: Vergleich der intrazellulären ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metaboliten-Konzentration und ^3H -dT-Einbauraten in die DNA.

$\text{pmol} \times 10^{-3}$ ^3H -dT bzw. Metaboliten des ^3H -dT/ 10^6 Zellen

4.3.9. Phosphorylierungsmuster des intrazellulären ^3H -dT

Die chromatographische Auftrennung des intrazellulär aufgenommenen ^3H -dT erbrachte keine signifikanten Unterschiede der Konzentrationen der einzelnen Phosphorylierungsstufen des Thymidins (Abb.40 und 41). Sowohl die Thymozyten der Kontrolltiere als auch die Zellen der mit 1000 mg DDC/kg behandelten Tiere wiesen nach einem schnellen Durchlaufen der Mono- und Diphosphatstufen die höchsten Konzentrationen an Thymidintriphosphat auf. Abb. 41 und 42 zeigen die Radiogramme eines Kontrolltieres und eines DDC-behandelten Tieres. Tab.7 stellt die prozentuale Verteilung der intrazellulären Phosphorylierungsstufen dar.

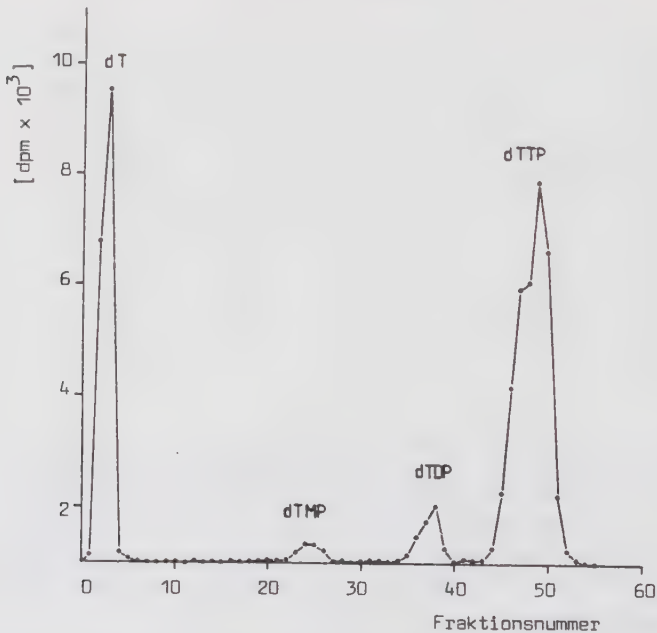


Abb.40: Phosphorylierungsmuster des intrazellulär aufgenommenen ^3H -dT eines Kontrolltieres.

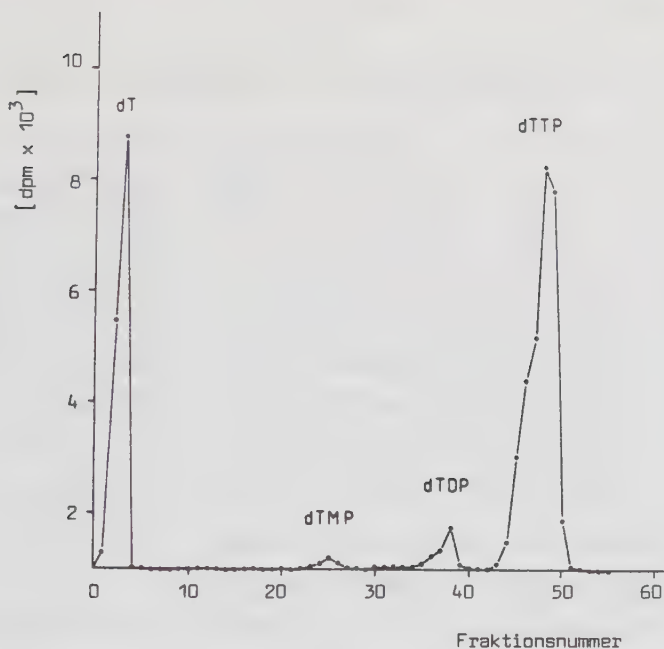


Abb.41: Phosphorylierungsmuster des intrazellulär aufgenommenen ^3H -dT eines DDC-behandelten Tieres. 1000 mg DDC/kg i.p., 1 h Überlebenszeit.

	dT	dTMP	dTDP	dTTP
Kontrolle (n = 2)	30,49 $\pm$ 1,12	2,17 $\pm$ 0,01	6,49 $\pm$ 1,18	60,87 $\pm$ 0,06
DDC (n = 2)	41,03 $\pm$ 13,9	1,33 $\pm$ 0,11	3,81 $\pm$ 0,91	53,83 $\pm$ 12,88

Tab. 7: Prozentuale Verteilung der Phosphorylierungsprodukte des intrazellulär aufgenommenen ^3H -dT.

n = Anzahl der Tiere

5. DISKUSSION

5.1. Hydroxyharnstoff (HU) und Reparatursynthese (UDS)

Die Fähigkeit von HU, die semikonservative DNA-Synthese in vivo und in vitro relativ spezifisch zu hemmen (80,90), wird u.a. in der experimentellen Biochemie genutzt; RNA- und Proteinsynthese werden hierbei nicht beeinträchtigt (13,20). Durch Blockade des Ribonucleotidreduktase-Systems kommt es zu einer Entleerung des Desoxyribosenucleotidtriphosphat-Pools und somit zu einem Mangel an DNA-Vorstufen (81,102). Noch bis in die jüngste Zeit wurde davon ausgegangen, daß die Reparatursynthese dagegen mit den bereits vor HU-Einfluß gebildeten Vorstufen auskommt und somit von ihrer Neusynthese weitgehend unabhängig ist (10,16). HU wird daher immer noch als Hilfsmittel eingesetzt, um Reparaturprozesse, die nur einen geringen Anteil der Gesamt-DNA-Synthese darstellen, durch Ausschalten der replikativen DNA-Synthese zu erfassen (93). Erst in den letzten Jahren bekanntgewordene, über die Hemmung der Ribonucleotidreduktase (RNR) hinausgehende Einflüsse auf den DNA-Metabolismus stellen zumindest die quantitative Erfassbarkeit der zellulären Reparatursynthese über die UDS (^3H -dT-Einbau in Gegenwart von HU) infrage. So weist die Akkumulation kleiner DNA-Fragmente nach HU-Zusatz auf verminderte Polymerasen-Aktivität hin; kurze DNA-Stränge werden zwar noch synthetisiert, die weitere Elongation und damit die Bildung größerer DNA-Intermediate jedoch behindert (108). Auch FRANCIS et al. folgern aus dem Mangel an Desoxyribonucleotidtriphosphaten auf

subsequente Restriktion der DNA-Polymerasen durch HU-Zusatz (34). Verminderte Ligasentätigkeit - als weiterer Wirkungsmechanismus von HU diskutiert - kann ebenfalls ein vermehrtes Auftreten kleinerer DNA-Syntheseprodukte durch Behinderung der weiteren Replikation bedingen (16,22). Die Beeinflussung der o.g. DNA-Enzymaktivitäten kann dazu führen, daß nicht nur die SDS, sondern auch die Reparatursynthese - wenn auch graduell unterschiedlich - durch HU beeinflußt werden, wobei sowohl über Stimulation als auch über Hemmung bei in vitro-Untersuchungen an isolierten Zellsystemen berichtet wurde: Über Inhibierung der Polymerisation und Ligation von Reparaturketten während der Excisionsreparatur kann es zu verminderter reparaturbedingter dNTP-Inkorporation bei höheren HU-Konzentrationen ($\geq 10^{-2}$ mol/l) kommen (16,34,107). CLARKSON dagegen berichtet über eine erhöhte Reparatursynthese nach Einwirkung von $2 \cdot 10^{-3}$ mol HU/l anhand von Untersuchungen an Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters (11). Ebenso sollen niedrige HU-Konzentrationen (10^{-5} bis 10^{-4} mol/l) die Initiation der DNA-Synthese bei BHK-Zellen stimulieren (65). Das Auftreten von DNA-Bruchstücken bei DNA-Reparaturanalysen an menschlichen Lymphoblasten läßt auch auf die Möglichkeit einer unmittelbaren DNA-Schädigung durch höhere Konzentrationen schließen. Vor allem bei Monooxygenasentätigkeit kann eine metabolische Aktivierung des Hydroxyharnstoffes mit nachfolgender H_2O_2 -Bildung durch die Hydroxylamino-Gruppe in Anwesenheit von O_2 erfolgen (5, 20). Als weitere Reaktionsprodukte des H_2O_2 können dann Superoxid- und Hydroxylradikale auftreten, die DNA-Schäden und nachfolgende Reparatur hervorrufen.

In den vorliegenden Untersuchungen lag die UDS (^3H -dT-Residual-Einbau in Gegenwart von HU) der Knochenmarkszellen bei in vivo-Analysen um den Faktor 8,5 höher als die der Thymuszellen (Tab. 5), was auf zellspezifische Unterschiede hinweist. Gegenüber der in vitro-Markierung der DNA war bei in vivo-Applikation des Tracers die absolute semikonservative DNA-Syntheseleistung der Knochenmarkszellen im Vergleich zu Thymozyten deutlich erhöht (4.3.1.3.). Dies kann bedeuten, daß die gewählten in vitro-Bedingungen nicht ausreichen, die tatsächliche replikative DNA-Synthesekapazität der Zellen - hier speziell der Knochenmarkszellen - vollständig zu erfassen. Somit wäre auch der relative UDS-Anteil der Knochenmarkszellen wesentlich niedriger anzusetzen.

5.2. UV-Bestrahlung

Die Wirkung von ultravioletten Strahlen ist an das Vorhandensein von UV-absorbierenden Chromophoren gebunden. Obgleich alle Basen der Nucleinsäuren ein Absorptionsmaximum im UV-Bereich besitzen, konnten nachweisbare Reaktionen nur an Pyrimidinbasen beobachtet werden (59). Die hierbei am häufigsten auftretenden Schäden sind Pyrimidindimere vom Cyclobutantyp, die nur zwischen benachbarten Pyrimidinbasen eines Stranges unter Auflösung der Doppelbindung zwischen den C_5 - und C_6 -Atomen gebildet werden. Als weitere Folgeprodukte der UV-Bestrahlung sind die (ebenfalls stabilen) Ad-

dukte - Verbindungen zwischen Pyrimidinbasen, die nicht zum Cyclobutantyp gehören - und Hydrate zu nennen. Bei sehr hohen UV-Dosen kommt es auch zu "Cross-links" zwischen Nucleinsäuremolekülen oder zwischen Nucleinsäuren und Proteinen (31). Dagegen treten Strangbrüche, im Gegensatz zur Wirkung ionisierender Strahlen, erst sekundär auf. Die Reparatur der durch UV-Licht induzierten Schäden wird - außer durch Postreplikationsreparatur - in erster Linie durch Excisionsreparatur in Form einer Langkettenexcision durchgeführt. Durch die Aktivität der Excisionsenzyme kann es dann während des Reparaturvorganges zu vorübergehenden Einschnitten in den DNA-Strang und somit zum Auftreten von Einzelstrangbrüchen und -lücken kommen (14,30).

Durch UV-Bestrahlung konnte die UDS der Knochenmarkszellen um durchschnittlich 26 %, die der Thymuszellen um 58 % stimuliert werden. Diese Effekte wurden bei Knochenmarkszellen mit einer UV-Dosis von $32 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$, bei Thymuszellen von $64 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$ erreicht, während jeweils höhere Dosen zu einem Abfall des UV-induzierten $^3\text{H-dT}$ -Einbaus führten (Abb.6 und 7,114). Somit deutet sich eine Sättigung der stimulierbaren DNA-Reparatur an, die auch andere Autoren bei Säugetierzellen feststellten (1,33,115). Für Knochenmarkszellen setzt dieser Effekt dosisabhängig wesentlich früher ein und fällt seinem Umfang nach geringer aus als bei Thymuszellen. Für diese unterschiedlichen Auswirkungen des UV-Lichtes auf die untersuchten Zellsysteme sind einerseits verschieden aktivierbare Reparatursysteme, andererseits auch eine Schädigung der Reparaturkapazität durch UV-Strahlen in Betracht zu ziehen (100). Ebenso kann die Reparaturkapazität durch unterschiedliche Größen

des DNA-Vorstufenpools der Zellsysteme wie auch durch die Geschwindigkeit des Reparaturverlaufs beeinflusst werden (115). WHEELER und WIEROWSKI konstatieren für röntgenstrahleninduzierte DNA-Schäden eine zeitabhängig biphasische Repairkinetik, die durch die Anzahl der Reparatursysteme, den Typ des Schadens und die Zugänglichkeit der geschädigten DNA-Bereiche für Reparatursysteme beeinflusst wird (112). Einer langsamen - von der Bestrahlungsdosis (1.250 bis 5.000 rad) abhängigen - Repairphase (ca. 1-7 h), die einen sättigbaren enzymatischen Prozeß darstellt und durch weniger zugängliche Regionen der Genome gekennzeichnet ist, steht eine schnelle - von der Bestrahlungsdosis unabhängige - Repairphase (ca. 3,5 min) gegenüber, die über gut für Reparatursysteme zugängliche Genomregionen nicht sättigbar ist. Dieses Modell auf UV-Licht-induzierte DNA-Schäden übertragen, könnte zu unterschiedlichen Reparaturkapazitäten verschiedener Zellsysteme führen. In Anbetracht des hohen Anteiles der unstimulierten UDS der Knochenmarkszellen erscheint auch eine spontan gegebene, weitgehende Auslastung der Reparatursysteme denkbar, so daß bei Schädigungen in größerem Umfang die Residualkapazität nicht mehr ausreicht, die erforderlichen Reparaturen durchzuführen.

5.3. DDC-Wirkungen

5.3.1. SDS und UDS

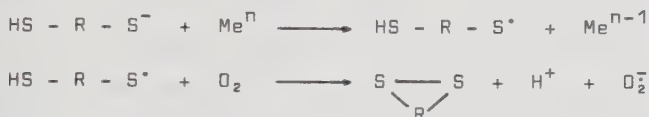
Da die Aktivität der Superoxiddismutase (SOD) von bestimmten zweiwertigen Kationen, etwa von Zn^{++} und Cu^{++} , abhängt, liegt es nahe, die Wirkung von DDC zunächst über Hemmung dieses Enzyms zu erklä-

ren. Die SOD stellt durch ihre Fähigkeit, Radikale abzufangen, einen wichtigen Schutzmechanismus der Zelle gegenüber endogen gebildeten O_2^- -Radikalen und den Folgeprodukten dar, die auch im normalen Stoffwechselgeschehen durch biologische Oxidations-Reduktions-Reaktionen ständig produziert werden (78). Arbeiten von DENEKE et al. und GOLDSTEIN et al. (19,41) belegen auch, daß bei mangelnder O_2^- -Beseitigung weitere Enzymaktivitäten beeinträchtigt werden. So erfolgt durch eine DDC-vermittelte Hemmung der SOD und den damit verbundenen Anstieg des endogenen O_2^- -Gehaltes der Zelle auch ein zeitlich verzögerter Abfall des Glutathionperoxidase-Spiegels. Da DDC neben der SOD und der o.g. Glutathionperoxidase eine Reihe weiterer Enzyme - u.a. die kupferhaltige Cytochromoxidase (35), mikrosomale Monooxygenasen (66) sowie die Dopamin- β -Hydroxylase (55) - zu hemmen vermag, erscheint ein allgemeiner Zusammenbruch des Zellmetabolismus bei länger anhaltender DDC-Wirkung nicht ausgeschlossen, der schließlich - mehr oder weniger unspezifisch - auch DNA-Synthesevorgänge beeinträchtigen würde. Zumindest die Thymusbefunde - Gewichtsabnahme und Zellverarmung dieses Organes (Abb.23) - lassen derartige Überlegungen zu. Jedoch zeigen mehrere Autoren, daß z.B. die Katalase, ein Enzym, das durch den Abbau von H_2O_2 zu O_2 und H_2O ebenfalls eine regulatorische Funktion für den Radikalgehalt der Zelle erfüllt, durch DDC nicht gehemmt werden kann (39, 49). HEIKKILA et al. schließen hieraus, daß speziell der SOD-Abfall nicht durch Zellverluste oder generell toxische Wirkungen von DDC bedingt sein kann (49). Abgesehen davon müßte man in diesem Fall erwarten, daß die Zytotoxizität von DDC konzen-

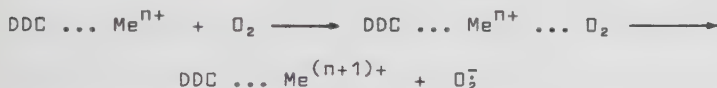
trationsabhängig, d.h. monophasisch zunimmt.

Versuche zur dosisabhängigen Hemmung des semikonservativen ^3H -dT-Einbaus in die DNA durch DDC in vitro erbrachten dagegen einen biphasischen Verlauf (15,17). Auch RIGAS et al. weisen auf eine biphasische Toxizität der Substanz *in vitro* hin, die sich anhand der Zellüberlebensrate, der ^3H -Uridin-Inkorporation und dem Verhalten der Radiosensibilität von Lympho- und Leukozyten des Menschen experimentell belegen ließ (85,86). Zu einer gleichfalls biphasischen Dosiswirkungskurve der Überlebensrate gelangten WESTMAN und MIDANDER an CHO-Zellen (110). Eine Erklärung für dieses Phänomen steht bisher aus. Die Reversibilität beider Toxizitätsphasen bei Zusatz von ZnCl_2 (1.Phase) bzw. CuCl_2 (2.Phase) deutet auf eine Inaktivierung entsprechender metallhaltiger Enzyme in den einzelnen Phasen hin; bemerkenswert ist allerdings, daß hierbei nur die 2.Phase eine Hemmung der SOD zeigte (86). Das Vorhandensein von SH-Gruppen im DDC-Molekül läßt auch auf eine thiolartige Wirkung der Substanz schließen (86), da Thiole konzentrationsabhängig ebenfalls biphasisch reagieren; die Zytotoxizität dieser Verbindungen verhält sich bei höheren Substanzkonzentrationen rückläufig (72,73). Dieser - vor allem *in vitro* zu beobachtende - als "paradoxe Toxizität" bezeichnete Effekt der Thiolverbindungen wird auf einen radikalvermittelten Angriff an der DNA zurückgeführt. Die in der ersten Toxizitätsphase auftretenden Radikale sind dabei durch Autooxidation der Thiole bedingt, die die Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und bivalenten Übergangsmetallen erfordert. MISRA beschreibt diese Autooxidation und Radikalinduktion, die bei höheren Thiolkonzentra-

tionen eine rückläufige Tendenz zeigen, mit folgendem Reaktionsschema:



Für die erste Toxizitätsphase ist auch die Bildung toxischer Chelate mit Metallionen nach dem Modell von RIGAS et al. denkbar (86). Diese Chelate sind in der Lage, ebenfalls Superoxidradikale zu bilden:



Erst Chelatkonzentrationen, die über denen des Metalles liegen, bedingen die Entstehung nicht-toxischer Chelate und damit die Aufhebung der schädigenden Wirkung:



Dieses Wirkungsmodell, auf DDC übertragen, würde die Rückläufigkeit der ersten Toxizitätsphase bei höheren DDC-Dosen erklären. Steigende DDC-Konzentrationen führen zur Bindung eines zweiten DDC-Moleküles und somit zu einem Rückgang der Radikalentstehung. Die beobachteten dosisabhängig biphasischen Effekte des DDC auf die semikonservative DNA-Synthese deuteten sich - wenngleich schwächer - auch bei in vitro-Untersuchungen der UDS (Abb.24 und 25), nicht dagegen in den Analysen zur dosisabhängigen in vivo-Wirkung an, die eine zunehmende Hemmung der SDS erkennen ließ (Abb.18 und 19). Diese Diskrepanz läßt jedoch

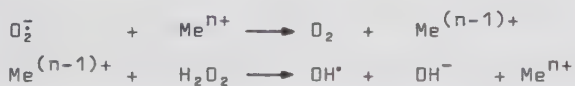
nicht auf ein in vivo und in vitro grundsätzlich verschiedenes Wirkungsmuster von DDC schließen. Vielmehr sind die Unterschiede in den untersuchten DDC-Konzentrationsbereichen zu sehen: Während sich die phasenspezifischen in vitro-Effekte jeweils erst bei Konzentrationserhöhungen um mindestens den Faktor 10 ergaben, konnte bei in vivo-Analysen insgesamt nur ein Konzentrationsbereich untersucht werden, der etwa 2 Konzentrationsstufen der in vitro-Studien entspricht. Auch die in vitro gemessene Wirkung von DDC in Abhängigkeit von der Zellkonzentration, die eine indirekte, d.h. auf die Zelle bezogen, Erniedrigung bzw. Erhöhung der DDC-Konzentration darstellt (Abb.15 bis 17), zeigte, daß die in vivo-Untersuchungen nur einen Teilbereich des gesamten Wirkungsspektrums der Substanz wiedergeben. Somit muß auch zunächst offenbleiben, ob die ermittelten in vivo-Effekte auf die SDS der ersten oder der zweiten Hemmphase der in vitro-Untersuchungen zuzuordnen sind.

In vivo-Studien zur UDS ergaben für beide Zellsysteme bei niedrigen - jedoch differierenden - DDC-Konzentrationen eine Stimulation des Tracereinbaues (Abb.26 und 27). Da diese DDC-Dosen gleichzeitig eine Hemmung der SDS bewirkten, liegt der Schluß nahe, in dem erhöhten ^3H -dT-Einbau bei Hemmung der SDS durch HU den Ausdruck von DNA-Reparaturprozessen zu sehen. Auch dies wäre mit der Annahme eines radiomimetischen Effektes bei niedrigen DDC-Konzentrationen vereinbar.

Zeitabhängige Versuche zur DDC-Wirkung in vivo ergaben erneut biphasische Effekte (Abb.20,21 und 29), die am ehesten an

pharmakokinetische Prozesse denken lassen: Verlängerte Wirkungszeiten von DDC bedingen möglicherweise eine zeitabhängig zunehmende Substanzkonzentration in einzelnen Organen. Somit wären die nach einer Stunde Überlebenszeit der Tiere erreichten Konzentrationen insgesamt der ersten und die folgende weitere Anreicherung der Substanz der zweiten Toxizitätsphase *in vitro* zuzuordnen.

Sowohl eine thiolartige Wirkung von DDC als auch die Entstehung toxischer Metallkomplexe oder eine durch DDC bedingte SOD-Hemmung führen intrazellulär zu einem erhöhten O_2^- -Gehalt. Radikale können unmittelbar an der DNA angreifen und zu Strangbrüchen führen. Für den schädigenden Effekt an der DNA sind jedoch weniger H_2O_2 und O_2^- als vielmehr Hydroxyradikale verantwortlich (60), die durch H^+ -Abspaltung vom Desoxyribose-Teil der DNA die benachbarten Phosphordiesterbindungen entstabilisieren und somit Strangbrüche hervorrufen (58). Aus O_2^- können Hydroxyradikale über eine HABER-WEISS-Reaktion in Gegenwart von Metallionen gebildet werden (87):



Die hierbei zu erwartenden DNA-Schädigungen mit Strangbruchbildung konnten allerdings mittels Nucleoidsedimentation für eine Dosis von 1000 mg DDC/kg vorliegend nicht nachgewiesen werden (Abb.34). Abgesehen davon, hätte man bei direktem Angriff von DDC an der DNA eine Verstärkung der Reparatursynthese gegenüber ungeschädigten Kontrollen auch bei hohen Dosen erwarten müssen,

was nicht der Fall war. Vielmehr wurde - abgesehen von niedrigen DDC-Dosen *in vivo* (125 mg/kg bei Thymuszellen, 250 - 500 mg/kg bei Knochenmarkszellen) auch der UDS-bedingte ^3H -dT-Einbau in die DNA gehemmt.

5.3.2. Bestrahlung

Die UV-induzierte reparaturbedingte DNA-Synthese wurde bei Knochenmarks- und Thymuszellen in den vorliegenden Untersuchungen durch keine der *in vivo* applizierten DDC-Dosen signifikant beeinträchtigt (Abb.26 bis 29). Auch *in vitro*-Untersuchungen an Knochenmarkszellen ließen keine DDC-Effekte auf die spezifische UV-Reparatur erkennen (Abb.24).

Bei Thymuszellen kam es *in vitro* dagegen bei hohen DDC-Konzentrationen (10 und 100 $\mu\text{g/ml}$) zu einem völligen Erliegen des UV-induzierten Reparatureenbaues von ^3H -dT (Abb.25), was auf eine unmittelbare Beeinflussung von Reparaturenzymen, etwa von DNA-Polymerasen, hinweisen könnte. DNA-Schäden nach UV-Bestrahlung unterliegen in erster Linie dem Mechanismus der Langkettenreparatur (61,69,106). Neuere Untersuchungen deuten immer mehr daraufhin, daß die DNA-Polymerase α , neben ihrer wichtigen Funktion für die semikonservative DNA-Synthese, an der Neusynthese längerer DNA-Reparaturketten, die während der UV-Reparatur gebildet werden müssen, beteiligt ist (14,23,69). Auch eine weitgehende Hemmung dieser Enzymaktivität (SH-haltig) würde somit fehlende Reparatursynthese erklären.

Die gegenüber unbehandelten Kontrolltieren nach *in vivo*-Appli-

kation von DDC geringgradig beschleunigte Nucleoidsedimentation der Thymuszellsuspensionen unmittelbar nach Röntgenbestrahlung weist auf eine Abschwächung des Strahlenschadens durch DDC hin. Radioprotektive Eigenschaften der Substanz sind schon seit langem bekannt (104), und erst kürzlich wie- sen EVANS et al. eine Erhöhung der $LD_{50/30}$ bei röntgenbestrahl- ten Mäusen um den Faktor 1,8 durch nichttoxische DDC-Konzen- trationen nach (26). Für das Zustandekommen dieses - bei hö- heren, nicht mehr zytotoxischen Thiolkonzentrationen beobach- teten (3,17) - Effektes kommen grundsätzlich alle Mechanismen in Betracht, die für die Strahlenschutzwirkung der Thiole bzw. Aminothiole verantwortlich gemacht werden. Ihre Eigenschaft beispielsweise, mit SH-Gruppen von Zellbestandteilen reversi- bel im Sinne der Bildung gemischter Disulfide zu reagieren und somit radikalvermittelte Angriffe auf empfindliche zelleigene Sulfhydrylgruppen zu vermindern, spielt dabei ebenso eine Rol- le wie die Wiederherstellung geschädigter Biomoleküle durch Wasserstoffabgabe ("chemische Reaktivierung"). Auch die Frei- setzung von Nicht-Protein-SH-Gruppen durch Thiole bzw. Amino- thiole und ihre Fähigkeit, Radikale abzufangen, scheint am Zu- standekommen des Schutzmechanismus gegenüber ionisierenden Strah- len beteiligt zu sein (18). Andererseits wird in zunehmendem Ma- ße daraufhingewiesen, daß eine störungsfreie Reparatur nur durch- geführt werden kann, wenn die replikative DNA-Synthese während der Reparaturzeit reduziert wird. Die semikonservative DNA-Syn- these wird "angehalten", um den Reparatursystemen zunächst die Möglichkeit zu geben, die Integrität der Matrize für die Repli-

kation wiederherzustellen (27,52). In der gleichzeitigen Hemmung der SDS könnte in der Tat ein Anhaltspunkt dafür gesehen werden, daß DDC in der Lage ist, die Zellen an der zu schnellen Wiederaufnahme der Zellteilung nach Bestrahlung zu hindern, und somit eine fehlerhafte DNA-Replikation zu vermeiden. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß die Hemmung der SDS eine allgemeine - bisher nicht befriedigend erklärte - Eigenschaft von Thiolen bzw. Aminothiolen zu sein scheint (43,50, 101).

5.3.3. Intrazelluläre ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metaboliten-Konzentration, ^3H -dT- bzw. ^3H -dT-Metaboliten-Rücktransport, Phosphorylierungsmuster

Für die konzentrationsabhängige Thymidinaufnahme in Säugetierzellen werden zwei verschiedene Transportsysteme postuliert (103). Ein als "low-affinity-System" bezeichneter Vorgang, der einer erleichterten Diffusion gleichkommt, kann als gemeinsamer Transportweg für alle Nucleoside betrachtet werden. Diesem nicht konzentrativen sättigbaren Prozeß steht ein "high-affinity-System" mit enger Substratspezifität gegenüber, das wahrscheinlich einen aktiven Carrierprozeß mit konzentrativer Wirkung darstellt. In proliferierenden Zellen sind nur sehr geringe intrazelluläre Konzentrationen freien Thymidins nachweisbar (79), da hier eine unmittelbare Phosphorylierung durch die Thymidinkinasen und ein anschließender Einbau des dTTP in die DNA erfolgt. Die chromatographische Auftrennung der einzelnen Phosphorylierungsprodukte des Thymidins zeigte, daß Thymozyten das

aufgenommene Thymidin schnell in seine Triphosphatstufe überführen (Abb.40 und 41) und in die DNA einbauen (Abb.38). Die gesamte intrazelluläre Thymidinkonzentration beträgt hierbei nur etwa 3 % des in die DNA eingebauten Tracers. Da gleiche Versuche, bei denen die semikonservative DNA-Synthese durch HU fast vollständig gehemmt worden war, keine entsprechend niedrigere intrazelluläre ^3H -dT-Konzentration aufwiesen, kann geschlossen werden, daß die DNA-Syntheseleistung den bestimmenden Faktor für die Thymidinaufnahme insgesamt darstellt und somit einen gewissen "Sogeffekt" bewirkt. Die umgekehrte Annahme, die DNA-Synthese sei von der Thymidinaufnahme abhängig, kann durch die fehlende Korrelation zwischen intrazellulärer Thymidinkonzentration und DNA-Syntheseleistung ausgeschlossen werden. Daraus kann auch gefolgert werden, daß nicht der Thymidintransport durch DDC beeinträchtigt wird, sondern wiederum die herabgesetzte DNA-Synthese für die geringere Thymidinkonzentration verantwortlich ist. Entsprechend der Überlegung, daß phosphorylierte Nucleoside die intakte Zellmembran nicht passieren können (53, 103), wurde der Rücktransport des ^3H -dT untersucht. Jedoch erwiesen sich die radioaktiven extrazellulären Thymidinkonzentrationen als zu gering, um eine Identifizierung der einzelnen Phosphorylierungsstufen durchzuführen. Da die extrazellulären ^3H -dT-Gehalte nach DDC-Behandlung prozentual und dem Verlauf nach denen unbehandelter Tiere folgten, kann eine durch Membranschäden bedingte Evasion bereits phosphorylierter Thymidinstufen weitgehend ausgeschlossen werden (Abb.37 und 39). Die Annahme, daß DDC keine unmittelbaren Membranschäden verur-

sacht, wird auch durch Arbeiten von KOSTER und VAN BERKEL (57) und BARTOLI et al. (7) unterstützt, die DDC sogar eine protektive Wirkung in vivo (1000 mg DDC/kg) und in vitro (nanomolare Konzentrationen) gegenüber induzierter Lipidperoxidation an Hepatozyten und Lebermikrosomen der Ratte zusprechen. Die Thymidinphosphorylierungsprodukte DDC-behandelter Tiere wiesen keinen signifikanten Unterschied gegenüber unbehandelten Kontrollen auf (Abb.40 und 41, Tab.7). Somit kann davon ausgegangen werden, daß sowohl die ATP-Versorgung der Zellen als auch die Thymidinkinasenaktivitäten der Thymuszellen durch DDC nicht beeinträchtigt werden.

5.3.4. RNA-Synthese

¹⁴C-U-Markierung der RNA führte bei Knochenmarks- und Thymuszellen nach einer Stunde Wirkungszeit von DDC zu leicht erhöhten Einbauraten (Abb.31). Die gleichzeitige Hemmung der DNA-Synthese läßt somit in dieser frühen Phase auf einen spezifischen Eingriff von DDC in den DNA-Metabolismus schließen. Nach 24stündiger Einwirkung von DDC erreichen die Synthesekapazitäten von Knochenmarkszellen für die DNA und RNA wieder ihre Ausgangswerte. Demgegenüber ergab sich zum gleichen Versuchszeitpunkt an Thymuszellen eine starke Hemmung der RNA-Synthese (Abb.31). Da in dem als erste Hemmphase bezeichneten Bereich keine Schädigung der RNA-Syntheseleistung beobachtet wurde, sind für die zu einem späteren Zeitpunkt erneut einsetzende DDC-Wirkung auf die Nucleinsäuresynthese andere Wirkungsmechanismen zu vermuten; sie bleiben Gegenstand weiterer Untersuchungen.

5.3.5. Endogener Thymidinpool

Der dNTP-Pool wird über die Ribonucleosid-Diphosphat-Reductase (RNR) reguliert. Die Reduktion der Ribonucleotide ist möglicherweise der limitierende Schritt der DNA-Synthese (18). Die RNR ihrerseits unterliegt einer allosterischen Regulation durch die von ihr synthetisierten Desoxyribonucleotide. Änderungen des endogenen Thymidinpools können die intrazelluläre ^3H -dT-Konzentration und damit den Grad der radioaktiven Markierung der DNA beeinflussen (9,88), was zu gravierenden Fehlinterpretationen der tatsächlichen Syntheseleistung aufgrund von Einbauversuchen führen kann. Aus dem Einfluß exogenen unmarkierten dT auf den ^3H -dT-Einbau in die DNA sollten Hinweise auf Änderungen des endogenen Thymidinpools unter DDC-Einfluß gewonnen werden (Abb.32 und 33). Dabei ergaben sich keine Anzeichen dafür, daß der intrazelluläre Thymidinpool in vitro durch die Substanz auch bei der hohen Konzentration von 100 µg/ml verändert wird, während die in vivo-Applikation von DDC auf Expansion des dT-Pools mit Verdünnung des Tracers hinwies. Die scheinbar widersprüchlichen Effekte könnten einerseits auf grundsätzliche Wirkungsunterschiede in vitro und in vivo schließen lassen, andererseits könnte unter in vitro-Bedingungen die de-novo-Synthese der DNA-Vorstufen durch eine veränderte Stoffwechsellage der Zellen (Energieverarmung, Mangel an benötigten Substraten) limitiert sein. Daraus würde sich - unabhängig vom DDC-Einfluß - eine bestimmte intrazelluläre Thymidinkonzentration ergeben, die nicht mehr erhöht werden kann.

HU, ein potentieller Hemmstoff der RNR, bedingt einen Anstieg des dTTP-Pools (9,81,102), der über veränderte allosterische Regulation der RNR erklärt wird. HU hemmt die DNA-Synthese über eine spezifische Entleerung des dGTP- und dATP-Pools. Der dGTP-Pool ist in allen Zellzyklusstadien der kleinste der dNTP-Pools und somit der letztlich limitierende Faktor für die DNA-Synthese (81). dTTP fungiert als positiver Effektor für die Reduktion von GDP, woraus folgt, daß der Anstieg des dTTP als mögliches Stimulans zum Auffüllen des dGTP-Pools wirkt. Der unter DDC-Einfluß in vivo wesentlich höhere Bedarf an exogenem unmarkiertem dT zur Erzielung der gleichen ^3H -dT-Einbauhemmung wie bei Kontrollen deutet gleichfalls auf eine Expansion des endogenen dT-Pools hin, woraus in Analogie zum HU-Effekt auf eine Hemmung der RNR durch DDC geschlossen werden kann. SH-Gruppen auf der katalytischen Seite des Enzyms können ebenso wie eine Fe^{3+} -enthaltende Untereinheit (82) Angriffspunkte für DDC darstellen; auch hier sind weitere Untersuchungen erforderlich.

5.4. Schlußfolgerungen und Ausblick

In den vorliegenden Analysen war der konzentrationsabhängige Einfluß von DDC in vitro auf die SDS und UDS der untersuchten Zellsysteme durch ein biphasisches Wirkungsmuster gekennzeichnet. Die gleichen Effekte zeigte die zeitabhängige Wirkung einer konstanten DDC-Dosis (1000 mg/kg KG) bei in vivo-Applikation. Somit ist das Wirkungsmuster von DDC grundsätzlich durch eine Biphasizität gekennzeichnet. Analysen, die dieses Wirkungs-

muster nicht zeigen, widersprechen nicht unbedingt dieser Vorstellung. Vielmehr ist das Fehlen der biphasischen Wirkungsweise in einem hier nicht weit genug gefaßten - oder erreichten - Konzentrationsbereich - wie im Falle der konzentrationsabhängigen DDC-Wirkung in vivo - zu sehen (s. auch 5.3.1.). Bezeichnet man die zeitabhängige DDC-bedingte Hemmung der SDS und UDS in vivo nach einer Stunde Überlebenszeit der Tiere mit Phase I und die erneut einsetzende Inhibierung der untersuchten Parameter nach vorübergehender Rückläufigkeit (2 h nach DDC-Applikation) mit Phase II, so kann man von einer unterschiedlichen Wirkungsweise der Substanz in den beiden Phasen sprechen. Analog zu den in vivo-Untersuchungen sind die DDC-Effekte in vitro zu sehen: Hemmung der SDS in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 10 µg/ml, Rückläufigkeit bei 100 µg/ml und erneute Hemmung bei 1000 µg/ml bzw. Hemmung der UDS bei 1 bis 10 µg/ml und Rückläufigkeit bei 100 µg/ml.

Phase I, die durch eine Hemmung der SDS und UDS gekennzeichnet ist, wird von einer leichten Stimulation der RNA-Synthese begleitet. Daraus kann geschlossen werden, daß DDC zumindest in dieser Phase vor allem in den DNA-Replikations- und -Reparaturmechanismus eingreift. Ein direkter Angriff von DDC an der DNA konnte durch den fehlenden Nachweis von DNA-Schäden mittels Nucleoid-sedimentation ausgeschlossen werden. Zusatzanalysen zum ³H-dT-Transport in die Zelle erbrachten keinen Hinweis auf einen Eingriff von DDC in die Aufnahme von DNA-Vorstufen (4.3.8.). Ebenso konnte keine signifikante Beeinträchtigung der Phosphorylierung der intrazellulär aufgenommenen DNA-Vorstufe gesehen werden.

Somit sind auch DDC-vermittelte Einflüsse auf die ATP-Versorgung der Zelle wie auch auf die Kinasenaktivität unwahrscheinlich.

Dagegen läßt die in Verdünnungsanalysen in Erscheinung getretene gleichzeitige Expansion des endogenen Thymidinpools auf einen DDC-bedingten Einfluß auf den DNA-Vorstufenmetabolismus auf Nucleotidebene schließen. Hierbei ist der RNR, die durch die Bereitstellung der Nucleotidtriphosphate für die Neusynthese von DNA-Strangstücken eine wesentliche Rolle spielt, besondere Bedeutung zuzumessen. Einen weiteren möglichen Angriffspunkt für DDC stellen die Enzyme des DNA-Replikations- und -Reparaturmechanismus dar. Hierbei ist vor allem an die Polymerase α , die sowohl für die DNA-Synthese als auch für die Neusynthese längerer DNA-Abschnitte der Langkettenexcisionsreparatur zuständig ist, zu denken. Eine Hemmung dieser Enzymaktivität würde sowohl die verminderte semikonservative DNA-Syntheseleistung als auch die herabgesetzte UDS erklären. Besondere Bedeutung gewinnt die Hemmung der SDS durch DDC im Rahmen des Strahlenschutzes. Eine vorübergehende Einschränkung der SDS gibt den Reparaturenzymen die Möglichkeit, geschädigte Abschnitte der DNA-Matrize wiederherzustellen und somit fehlerhafte Replikation zu vermeiden (s. auch 5.3.2.). Diese Effekte konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei kleinen DDC-Dosen beobachtet werden; so deutete sich z.B. an Thymuszellen bei einer DDC-Dosis von 125 mg/kg KG und bei Knochenmarkszellen bei Dosen von 250 und 500 mg DDC/kg KG eine Hemmung der SDS mit gleichzeitiger Stimulation der UDS an. Eine mögliche Erklärung ist darin zu sehen, daß die

Restaktivität der Polymerase α noch ausreicht, um DNA-Abschnitte im Rahmen der UDS zu synthetisieren. Auch die geringgradig beschleunigte Thymusnucleoidsedimentation DDC-behandelter ganzkörperstrahlter Tiere gibt Hinweise auf radioprotektive Eigenschaften der Testsubstanz.

Die Rückläufigkeit der beobachteten DDC-Effekte ist am ehesten mit einer thiolartigen Wirkung der Substanz zu erklären. Auch die Aufhebung von in Phase I gebildeten gemischten Disulfiden des DDC mit Zellbestandteilen - evtl. Inaktivierung von DDC durch Bildung nichttoxischer DDC-Metallkomplexe - ist in Betracht zu ziehen (s.auch 5.3.1.).

Die später erneut einsetzende Hemmung der untersuchten Parameter begegnet bei der Diskussion besonderen Schwierigkeiten. Für die untersuchten Zellsysteme ergaben sich zum Teil unterschiedliche Wirkungen der Testsubstanz. Während SDS und UDS bei beiden Zellsystemen erneut gehemmt wurden, verhielt sich die RNA-Synthese gegensätzlich; Thymozyten zeigten eine starke Hemmung, Knochenmarkszellen dagegen eine Stimulation, was auf weiterreichende zellspezifische Eingriffe von DDC in den Zellmetabolismus hinweist.

Zur weiteren Klärung der Wirkungsweise von DDC bieten sich folgende Analysen an:

1. Direkte Messung der DNA-Polymerase α -Aktivität unter DDC-Einfluß.
2. Direkte Messung der Ribonucleotidreduktase-Aktivität unter DDC-Einfluß.

Ebenso erfordert der Einsatz von DDC im Rahmen des chemischen

Strahlenschutzes als Zusatzanalysen u.a. die Untersuchung der Wirkung kleiner DDC-Dosen in vivo auf die SDS und UDS sowie Studien zum Reparaturverhalten der Zellen unter DDC-Einfluß nach Ganzkörperröntgenbestrahlung über einen längeren Zeitraum nach Strahlenexposition.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Wirkung von Diäthylthiocarbamat (DDC) auf die semikonservative (SDS) und reperaturbedingte DNA-Synthese (UDS) wurde an Knochenmarks- und Thymuszellen der Ratte in vitro und in vivo über den Einbau von ^3H -Thymidin (^3H -dT) in die DNA gemessen. Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von DDC galten möglichen Einflüssen auf Transport und intrazelluläre Phosphorylierung von dT, den endogenen dT-Pool und die RNA-Synthese. Die wesentlichen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. In vitro-Analysen zur DNA-Synthese:

Der semikonservative ^3H -dT-Einbau wurde bei Knochenmarks- und Thymuszellen durch DDC in Konzentrationen von 1 - 1000 $\mu\text{g/ml}$ biphasisch gehemmt.

Der nicht-stimulierte unprogrammierte ^3H -dT-Einbau wurde bei beiden Zellsystemen durch 0,1 - 100 μg DDC/ml gehemmt. Der durch UV-Licht stimulierte Anteil des unprogrammierten ^3H -dT-Einbaues blieb bei Knochenmarkszellen unbeeinflusst, während DDC-Konzentrationen von 10 und 100 $\mu\text{g/ml}$ bei Thymuszellen zu einer vollständigen Hemmung führten.

2. In vivo-Analysen zur DNA-Synthese:

1 h nach i.p.-Injektion von DDC in Dosen von 125 - 1000 bzw. 250 - 1000 mg/kg KG war der in vitro gemessene semikonservative ^3H -dT-Einbau in die DNA von Knochenmarks- bzw. Thymuszellen dosisabhängig um maximal 40 bzw. 77 % gehemmt. Wurde die Wirkung von DDC zeitabhängig gemessen, ergab sich für die hier gewählte Dosis von 1000 mg DDC/kg KG nach 1 h bei beiden Zellsystemen

eine Hemmung des semikonservativen ^3H -dT-Einbaues; nach 2 h war diese Wirkung aufgehoben und setzte nach 4 h erneut ein. Der unprogrammierte ^3H -dT-Einbau wurde durch kleine DDC-Dosen bei Knochenmarkszellen (250 und 500 mg/kg KG) und Thymozyten (125 mg/kg KG) - jedoch nicht signifikant - stimuliert. Höhere DDC-Dosen führten bei Knochenmarkszellen (750-1000 mg/kg KG) und Thymozyten (250-1000 mg/kg KG) zu einer Hemmung der Einbauraten. Zeitabhängig traten bei Knochenmarkszellen nach 1 bis 4 h eine Hemmung und nach 8 h eine Stimulation des unprogrammierten ^3H -dT-Einbaues auf. Die Einbauraten der Thymuszellen wurden dagegen im gleichen Untersuchungsbereich biphasisch gehemmt.

3. Die RNA-Synthese (Einbau von ^{14}C -markiertem Uridin) war 1 h nach i.p.-Injektion von 1000 mg DDC/kg KG nicht beeinflusst, nach 24 h dagegen gehemmt. Thymuszellen zeigten nach 1 h eine Erhöhung, nach 24 h eine Verminderung der ^{14}C -Einbauraten.

4. Die Wirkung von DDC auf den endogenen Thymidinpool von Thymuszellen wurde durch Verdünnung des Pools mit unmarkiertem Thymidin anhand der ^3H -dT-Einbauraten in die DNA untersucht: In vitro konnte kein Einfluß von DDC (100 µg/ml) auf den endogenen Thymidinpool festgestellt werden. In vivo-Applikation von 1000 mg DDC/kg KG führte zu einer Expansion des Pools nach 1 bis 4 h Überlebenszeit der Tiere.

5. Die Sedimentation von Thymusnucleoiden in einem neutralen Saccharose-Gradienten (15 bis 30 %) zeigte keine Unterschiede zwischen DDC-behandelten Ratten und Kontrolltieren.

6. Das mittels HPLC-Technik gemessene Phosphorylierungsmuster

des intrazellulär aufgenommenen ^3H -dT wurde durch DDC (1000 mg/kg KG) nicht verändert.

Aus den Ergebnissen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. Die biphasischen Substanzeffekte lassen auf eine thiolartige Wirkung von DDC schließen.
2. Die DNA-Synthese von Thymuszellen wird durch DDC stärker beeinträchtigt als die von Knochenmarkszellen.
3. DDC führt - zumindest in vivo - nicht zu einer unmittelbaren Schädigung der DNA.
4. Mögliche Angriffspunkte für DDC stellen demgegenüber die Ribonucleotidreduktase und/oder DNA-Polymerasen dar.

SUMMARY

Replicative and unscheduled (repair induced) deoxyribonucleic acid synthesis in thymocytes and bone marrow cells of the rat under the influence of diethyldithiocarbamate (DDC).

The effect of diethyldithiocarbamate (DDC) on the replicative and repair induced DNA synthesis was tested on rat bone marrow cells and thymocytes in vitro and in vivo by using the incorporation of tritium labeled thymidine (^3H -dT). Investigations into the mode of action of DDC were made to find out if there were any possible influences on: transport and intracellular phosphorylation of dT, endogenous dT pool and RNA synthesis.

The essential results may be summarized as follows:

1. Analyses of DNA synthesis in vitro:

The replicative incorporation of ^3H -dT in bone marrow cells and thymocytes was inhibited biphasically by DDC (1 to 1000 $\mu\text{g/ml}$).

The unstimulated unscheduled incorporation of ^3H -dT in both types of cells was inhibited by DDC (0,1 to 100 $\mu\text{g/ml}$). The UV stimulated part of the unscheduled incorporation of ^3H -dT in bone marrow cells was not influenced, but was in thymocytes completely suppressed by DDC concentrations of 10 and 100 $\mu\text{g/ml}$.

2. Analyses of DNA synthesis in vivo:

One hour after i.p. injection of DDC in doses of 125 to 1000 and 250 to 1000 mg/kg b.w. respectively, the in vitro measured replicative incorporation of ^3H -dT in the DNA of bone marrow cells and thymocytes respectively was inhibited dose-dependently

not exceeding 40 and 77 % respectively. The time-dependent effect of DDC revealed that after 1 hr, the replicative incorporation of ^3H -dT was inhibited in both types of cells by a dose of 1000 mg DDC/kg b.w. This effect was nullified after 2 hrs, but returned after 4 hrs.

The unscheduled incorporation of ^3H -dT was stimulated without significance by small doses of DDC in bone marrow cells (250 and 500 mg DDC/kg b.w.) and thymocytes (125 mg DDC/kg b.w.). Higher doses of DDC caused a decrease in the incorporation rate of bone marrow cells (750-1000 mg DDC/kg b.w.) and thymocytes (250 -1000 mg DDC/kg b.w.).

Bone marrow cells indicated a time-dependent inhibition of the unscheduled incorporation of ^3H -dT from 1 to 4 hrs and a stimulation 8 hrs after drug administration, whereas the incorporation rates of thymocytes were inhibited biphasically within the same range of investigation.

3. The RNA synthesis (incorporation of ^{14}C labeled uridine) was not influenced by 1000 mg DDC/kg b.w. one hour after i.p. injection, but after 24 hrs was inhibited. Thymocytes showed an enhancement of the incorporation of ^{14}C -uridine after 1 hr and a decrease after 24 hrs.

4. The effect of DDC on the endogenous thymidine pool of thymocytes which was diluted with unlabeled thymidine was investigated by the incorporation of ^3H -dT in the DNA:

In vitro, there was no influence of DDC (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) on the endogenous thymidine pool. In vivo administration of 1000 mg DDC/kg b.w. caused an expansion of the pool 1 to 4 hrs after injection.

5. The sedimentation rate of thymic nucleoids in a neutral sucrose gradient (15 to 30 %) didn't show any difference between rats treated with DDC (1000 mg/kg b.w.) and controls.

6. The pattern of phosphorylation of the intracellular ^3H -dT measured by HPLC wasn't altered by DDC (1000 mg/kg b.w.).

From the results the following conclusions may be drawn:

1. The biphasic effects of the tested substance may be caused by an action similar to thiols.
2. The DNA synthesis of thymocytes is more impaired by DDC than the DNA synthesis of the bone marrow cells.
3. At least in vivo, DDC didn't directly damage the DNA.
4. In contrast to this, the ribonucleotide reductase and/or DNA polymerases represent possible target points for DDC.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Ahmed, F.E., R.B. Setlow:
Saturation of DNA Repair in Mammalian Cells.
Photochem. Photobiol. 29, 983 - 989 (1979)
- 2 Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts,
J.D. Watson:
The Molecular Biology of the Cell.
New York & London, Garland Publishing, Inc. (1983)
- 3 Alper, T.:
Cellular Radiology.
Cambridge, London, New York, Melbourne, University
Press (1979)
- 4 Altschuh, C.P., F.R. Ungemach:
Eine Ein-Schritt-Methode zur Trennung von Nucleosiden
und ihren Mono-, Di- und Triphosphaten mittels HPLC an
Anionenaustauschern.
Abs. Comm., 95 - 96, Erster Gesamtkongreß der Pharmazeu-
tischen Wissenschaften, München (1983)
- 5 Andrae, U., H. Greim:
Induction of DNA Repair Replication by Hydroxyurea in
Human Lymphoblastoid Cells Mediated by Liver Microsomes
and NADPH.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 87, 50 - 58 (1979)
- 6 Bajaj, M.H., N.K. Notani:
Repair of the Cellular Genetic Material.
Biochem. Rev. 47, 78 - 88 (1976)
- 7 Bartoli, G.M., A. Müller, E. Cadenas, H. Sies:
Antioxidant Effect of Diethyldithiocarbamate on Microso-

- somal Lipid Peroxidation Assessed by Low-Level Chemiluminescence and Alkane Production.
FEBS Letters 164, 371 - 374 (1983)
- 8 Bartosz, G., W. Leyko:
Radioprotection of Bovine Erythrocytes to Haemolysis.
Int. J. Radiat. Biol. 39, 39 - 46 (1981)
- 9 Bianchi, V., A. Zantedeschi, A.G. Levis:
The Scintillometric Evaluation of DNA Repair Synthesis
Can Be Distored by Changes of Thymidine Pool Radioactivity.
Chem.-Biol. Interact. 43, 17 - 31 (1983)
- 10 Castellot, J., M. Miller, D. Lehtomaki, A. Pardee:
Comparison of DNA Replication and Repair Enzymology
Using Permeabilized Baby Hamster Kidney Cells.
J. Biol. Chem. 254, 6904 - 6908 (1979)
- 11 Clarkson, J.M.:
Enhancement of Repair Replication in Mammalian Cells
by Hydroxyurea.
Mutat. Res. 52, 273 - 284 (1978)
- 12 Cleaver, J.E.:
Methods for Studying Excision Repair of DNA Damaged by
Physical and Chemical Mutagens.
pp. 19 - 48 in:
Handbook of Mutagenicity Test Procedures.
Hrsg.: E. Kilbey, New York, Amsterdam, Oxford, Elsevier/North Holland, Biomedica Press (1977)
- 13 Cleaver, J.E.:
Inhibition of DNA Replication by Hydroxyurea and Caffeine in an Ultraviolet-Irradiated Human Fibroblast

Cell Line.

Mutat. Res. 82, 159 - 171 (1981)

- 14 Cleaver, J.E.:

Structure of Repaired Sites in Human DNA Synthesized
in the Presence of Inhibitors of DNA Polymerases alpha
and beta in Human Fibroblasts.

Biochim. Biophys. Acta 739, 301 - 311 (1983)

- 15 Cocco, D., L. Calabrese, A. Rigo, E. Argese, G. Rotilio:

Re-Examination of the Reaction of Diethyldithiocarbamate
with the Copper of Superoxide Dismutase.

J. Biol. Chem. 256, 8983 - 8986 (1981)

- 16 Collins, A., S. Squires, R.T. Johnson:

Inhibitors of Repair DNA Synthesis.

Nucleic Acids Res. 10, 1203 - 1213 (1982)

- 17 Copeland, E.S.:

Mechanisms of Radioprotection - A Review.

Photochem. Photobiol. 28, 839 - 844 (1978)

- 18 Cory, J.G.:

Role of Ribonucleotide Reductase in Cell Division.

Pharmac. Ther. 21, 265 - 276 (1983)

- 19 Deneke, S.M., B.L. Fanburg:

Involvement of Glutathione Enzymes in O₂ Tolerance
Development by Diethyldithiocarbamate.

Biochem. Pharmacol. 29, 1367 - 1373 (1980)

- 20 De Sessa, J.M.:

Cell Death and Free Radicals. A Mechanism for HU-Terato-
genesis.

Medical Hypotheses 5, 937 - 951 (1979)

- 21 Dietrich, R.A., V.C. Erwin:
Mechanism of the Inhibition of Aldehyde Dehydrogenase
in Vivo by Disulfiram and Diethyldithiocarbamate.
Mol. Pharmacol. 7, 301 - 307 (1971)
- 22 Downes, C.S., A.R.S. Collins:
Effects of DNA Replication Inhibitors on UV Excision
Repair in Synchronized Human Cells.
Nucleic Acids Res. 10, 5357 - 5368 (1982)
- 23 Dresler, S.L., M.W. Lieberman:
Identification DNA Polymerases Involved in DNA Excision
Repair in Diploid Human Fibroblasts.
J. Biol. Chem. 258, 9990 - 9994 (1983)
- 24 Elliott, W.C., S.R. Newcom, D.C. Houghton, J. Baines-
Hunter, W.M. Bennett:
Dis-Diamminedichloroplatinum(II) Nephrotoxicity:
Tubular Function after Rescue with Sodium Diethyldi-
thiocarbamate in Rats.
Cancer Res. 43, 3759 - 3762 (1983)
- 25 Evans, R.G., J. Nielsen, C. Engel, C. Wheatley:
Enhancement of Heat Sensitivity and Modification of
Repair of Potentially Lethal Heat Damage in Plateau-
Phase Cultures of Mammalian Cells by Diethyldithio-
carbamate.
Radiat. Res. 93, 319 - 325 (1983)
- 26 Evans, R.G., C.R. Engel, C.L. Wheatley, J.R. Nielsen,
L.J. Ciborowski:
An in Vivo Study of the Radioprotective Effect of Di-
ethyldithiocarbamate (DDC).
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 9, 1635 - 1640 (1983)

- 27 Evans, R.G., C. Engel, C. Wheatley, J. Nielsen:
Modification of the Sensitivity and Repair of Potentially Lethal Damage by Diethyldithiocarbamate During and Following Exposure of Plateau-Phase Cultures of Mammalian Cells to Radiation and Cis-Diamminedichloroplatinum(II).
Cancer Res. 42, 3074 - 3078 (1982)
- 28 Faimann, M.D., L. Artman, T. Maziasz:
Diethyldithiocarbamate Acid-Methyl Ester Distribution, Elimination, and LD₅₀ in the Rat after Intraperitoneal Administration.
Alcoholism Clin. Exper. Res. 7, 307 - 311 (1983)
- 29 Fiszer-Szafarz, B., D. Szafarz, A.G. De Murillo:
A General, Fast, and Sensitive Micromethod for DNA Determination: Application to Rat and Mouse Liver, Rat Hepatoma, Human Leukocytes, Chicken Fibroblasts, and Yeast Cells.
Analyt. Biochem. 110, 165 - 170 (1981)
- 30 Fornace, A.J.:
Detection of DNA Single-Strand Breaks Produced during the Repair of Damage by DNA-Protein Cross-Linking Agents.
Cancer Res. 42, 145 - 149 (1982)
- 31 Fornace, A.J., K.W. Kohn, H.E. Kann:
DNA Single-Strand Breaks during Repair of UV Damage in Human Fibroblasts and Abnormalities of Repair in Xeroderma Pigmentosum.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 39 - 43 (1976)
- 32 Forth, W., D. Henschler, W. Rummel:
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.

4. Auflage
Mannheim, Wien, Zürich, Bibliograph. Institut (1983)
- 33 Francis, A.A., R.D. Snyder, W.C. Dunn, J.D. Regan:
Classification of Chemical Agents as to their Ability
to Induce Long- or Short-Patch DNA Repair in Human
Cells.
Mutat. Res. 83, 159 - 169 (1981)
- 34 Francis, A.A., R.D. Blevins, W.L. Carrier, D.P. Smith,
J.D. Regan:
Inhibition of DNA Repair in Ultraviolet-Irradiated
Human Cells by Hydroxyurea.
Biochim. Biophys. Acta 563, 385 - 392 (1979)
- 35 Frank, L., D.L. Wood, R.J. Roberts:
Effect of Diethyldithiocarbamate on Oxygen Toxicity
and Lung Enzyme Activity in Immature and Adult Rats.
Biochem. Pharmacol. 27, 251 - 254 (1978)
- 36 Friedberg, E.C., T. Bonura, J.D. Love, S. McMillan,
E.H. Radany, R.A. Schultz:
The Repair of DNA Damage: Recent Developments and
New Insights.
J. Supramol. Struct. Cell. Biochem. 16, 91 - 103 (1981)
- 37 Gale, G.R., A.B. Smith, E.M. Walker, Jr.:
Diethyldithiocarbamate in Treatment of Acute Cadmium
Poisoning.
Ann. Clin. Lab. Sci. 11, 476 - 480 (1981)
- 38 Gale, G.R., L.M. Atkins, E.M. Walker, Jr., A.B. Smith,
J.B. Hynes:
Comparative Effects of Three Dialkyldithiocarbamates
on Acute Toxicity, Organ Distribution, and Excretion

of Cadmium.

Ann. Clin. Lab. Sci. 13, 207 - 216 (1983)

- 39 Geerts, A., F. Roels:

In Vivo Cooperation between Hepatic Catalase and Superoxide Dismutase Demonstrated by Diethyldithiocarbamate.

FEBS Letters 140, 245 - 247 (1982)

- 40 Goette, A.:

Einfluß einiger radioprotektiver und radiosensibilisierender Verbindungen auf die semikonservative und reparaturbedingte DNA-Synthese von Rattenmilzzellen in vitro.

Diss. med. vet. München (1982)

- 41 Goldstein, B.D., M.G. Rozen, J.C. Quintavilla, M.A. Amaruso:

Decrease in Mouse Lung and Liver Glutathione Peroxidase Activity and Potentiation of the Lethal Effects of Ozone and Paraquat by the Superoxide Dismutase Inhibitor Diethyldithiocarbamate.

Biochem. Pharmacol. 28, 27 - 30 (1979)

- 42 Goldstein, M., B. Anagnoste, E. Lauber, M.R. McKereghan:

Inhibition of Dopamine- β -Hydroxylase by Disulfiram.

Life Sci. 3, 763 - 767 (1964)

- 43 Goutier, R., L. Baugnet-Mathieu:

Radiation Damage and Sulfhydryl Compounds.

Wien, Int. Atom. En. Agency (1969)

- 44 Grafström, R., F.E. Greene:

Differential Effects of Disulfiram and Diethyldithiocarbamate on Small Intestinal and Liver Microsomal

- Benzo(a)pyrene Metabolism.
Biochem. Pharmacol. 29, 1517 - 1523 (1980)
- 45 Graubmann, S., E. Dikomey:
Induction and Repair of DNA Strand Breaks in CHO-
Cells Irradiated in Various Phases of the Cycle.
Int. J. Radiat. Biol. 43, 475 - 483 (1983)
- 46 Grossman, L.:
Enzymatic Mechanism of DNA Repair.
Natl. Cancer Inst. Monogr. 58, 189 - 192 (1981)
- 47 Hano, J., J. Bugajski, L. Danek:
Effects of Drugs Interfering with Catecholamine Me-
tabolism on Stress-Induced Gastric Ulcers in the Rat.
Pol. J. Pharmacol. Pharm. 29, 629 - 638 (1977)
- 48 Harbers, E.:
Nucleinsäuren. Biochemie und Funktionen.
2.Auflage
Stuttgart, Georg Thieme Verlag (1975)
- 49 Heikkila, R.E., F.S. Cabbat, G. Cohen:
In Vivo Inhibition of Superoxide Dismutase in Mice
by Diethyldithiocarbamate.
J. Biol. Chem. 251, 2182 - 2185 (1976)
- 50 Heim, F., P. Mitznegg:
Die radioprotektive Wirkung des Cysteamins auf die
DNA-Synthese und den DNA-Gehalt der Leber in Abhängig-
keit vom Alter.
pp. 107 - 120 in:
Alterstheorien, Gießener Symp. Exp. Gerontol.,
3rd. 1975, Hrsg.: D. Platt
Stuttgart, Schattauer (1976)

- 51 Howard-Flanders, P.:
Inducible Repair of DNA.
Sci. Amer. 245, 72 - 80 (1981)
- 52 Iliakis, G., M. Nüsse:
The Importance of G1/S-Border and Mitosis in the
Fixation of Potentially Lethal Damage.
Radiat. Environ. Biophys. 22, 201 - 207 (1983)
- 53 Jungermann, K., H. Möhler:
Biochemie.
Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag (1980)
- 54 Karlson, P.:
Biochemie.
12.Auflage
Stuttgart, Georg Thieme Verlag (1984)
- 55 Kawakami, M., S. Ohno:
Effects of Diethyldithiocarbamate (DDC), Fusaric Acid,
Catecholaminergic and Serotonergic Receptor Blockers
on the Ascending Pathway from the Ventrolateral Part
of the Medulla Oblongata.
Endocrinol. Jpn. 29, 265 - 270 (1982)
- 56 Khandekar, J.D.:
Improved Therapeutic Index of Cis-Diammine Dichloro-
Platinum by Diethyldithiocarbamate in Rodents.
Res. Comm. Chem. Path. Pharmacol. 40, 55 - 66 (1983)
- 57 Koster, J.F., T.J.C. Van Berkel:
The Effect of Diethyldithiocarbamate on the Lipid
Peroxidation of Rat-Liver Microsomes and Intact Hepa-
tocytes.
Biochem. Pharmacol. 32, 3307 - 3310 (1983)

- 58 Kuhnlein, U.:
Disulfiram Inhibits DNA Breakage by Hydroxylradical-
Producing Agents.
Biochim. Biophys. Acta 609, 75 - 83 (1980)
- 59 Laskowski, W.:
Biologische Strahlenschäden und ihre Reparatur.
Berlin, New York, Walter de Gruyter (1981)
- 60 Lesko, S.A., R.J. Lorentzen, P.O.P. Ts'o:
Role of Superoxide in Deoxyribonucleic Acid Strand
Scission.
Biochemistry 19, 3023 - 3028 (1980)
- 61 Lieberman, M.W.:
Alterations in Chromatin Structure during DNA Excision
Repair.
Basic Life Sci. 20, 303- 314 (1982)
- 62 Lin, P.S., L. Kwock, C.E. Butterfield:
Diethyldithiocarbamate Enhancement of Radiation and
Hyperthermic Effects on Chinese Hamster Cells in Vitro.
Radiat. Res. 77, 501 - 511 (1979)
- 63 Lin, P.S., L. Kwock, P. Lui, K. Hefter:
Enhancement of Oxygen Toxicity by Diethyldithiocarba-
mate on Chinese Hamster and Mouse Cells.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 5, 1699 - 1703 (1979)
- 64 Lin, P.S., L. Kwock, N.T. Goodchild:
Copper Chelator Enhancement by Bleomycin Cytotoxicity.
Cancer 46, 2360 - 2364 (1980)
- 65 Manso-Martinez, R., J. Avila:
Separate Effect of Hydroxyurea on the Initiation and

Elongation of DNA-Synthesis in BHK Cells.

Mol. Cell. Biochem. 20, 183 - 189 (1978)

- 66 Masuda, Y., N. Nakayama:

Protective Action of Diethyldithiocarbamate and Carbon Disulfide against Acute Toxicities Induced by 1,1-Dichloroethylene in Mice.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 71, 42 - 53 (1983)

- 67 McWilliams, R.S., W.G. Cross, J.G. Kaplan, H.C. Birnboim:

Rapid Rejoining of DNA Strand Breaks in Resting Human Lymphocytes after Irradiation by Low Doses of Co γ Rays or 14.6-MeV Neutrons.

Radiat. Res. 94, 499 - 507 (1983)

- 68 Miller, G.E., M.A. Zemaitis, F.E. Greene:

Mechanisms of Diethyldithiocarbamate-Induced Loss of Cytochrome P-450 from Rat Liver.

Biochem. Pharmacol. 32, 2433 -2442 (1983)

- 69 Miller, M.R., L.H. Lui:

Participation of Different DNA Polymerases in Mammalian DNA Repair Synthesis is not Related to "Patch Size".

Biochem. Biophys. Res. Comm. 108, 1676 - 1682 (1982)

- 70 Misra, H.P.:

Generation of Superoxide Free Radical during the Autoxidation of Thiols.

J. Biol. Chem. 249, 2151 - 2155 (1974)

- 71 Misra, H.P.:

Reaction of Copper-Zinc Superoxide Dismutase with Diethyldithiocarbamate.

J. Biol. Chem. 254, 11623 - 11628 (1979)

- 72 Modig, H.G., M. Edgren, L. Révész:
Effect of Radioprotective Aminoethiols on the Induction
and Repair of Single-Strand Breaks in the DNA of Irra-
diated Mammalian Cells.
Acta Radiol. Ther. Phys. Biol. 16, 245 - 256 (1977)
- 73 Mori, T., M. Horikawa, O. Nikaïdo, T. Sugahara:
Comparative Studies on Protective Effect of Various
Sulphydryl Compounds against Cell Death and DNA
Strand Breaks Induced by X-Rays in Cultured Mouse
L Cells.
J. Radiat. Res. 19, 319 - 335 (1978)
- 74 Narang, S.A.:
DNA Synthesis.
Tetrahedron 39, 3 - 22 (1983)
- 75 National Cancer Institute:
Bioassay of Sodium Diethyldithiocarbamate for Possible
Carcinogenesis.
Techn. Rep. Series 172 (1979)
- 76 Neveu, P.J., D. Perdoux, L. Lafleur:
In Vivo Enhancement of Mitogen-Induced Lymphocyte DNA
Synthesis by Sodium Diethyldithiocarbamate DTC.
Int. J. Immunopharmac. 4, 9 - 13 (1982)
- 77 Neveu, P., N. Buscot, D. Thierry:
Effect of Sodium Diethyldithiocarbamate on Mitogen
Induced Lymphoproliferation "in Vitro".
Biomedicine 33, 247 - 248 (1980)
- 78 Nohl, H.:
Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von
Superoxid-Radikalen und die regulatorische Rolle des

Enzyms Superoxiddismutase.

Klin. Wochenschr. 59, 1081 - 1091 (1981)

- 79 Plagemann, P.G.W., D.R. Richey:

Transport of Nucleosides, Nucleic Acid Bases, Choline and Glucose by Animal Cells in Culture.

Biochim. Biophys. Acta 344, 263 - 305 (1974)

- 80 Rajewski, M.F., D.F. Hülser, E. Fabricius:

Untersuchungen zur Synchronisation in vivo: Temporäre Inhibition der DNA-Synthese durch Hydroxyharnstoff in normalen und malignen Säugerzellsystemen.

Z. Krebsforsch. 76, 266 - 292 (1971)

- 81 Reichard, P.:

From Deoxynucleotides to DNA Synthesis.

Fed. Proc. 37, 9 - 14 (1978)

- 82 Reichard, P., A. Ehrenberg:

Ribonucleotide Reductase - A Radical Enzyme.

Science 221, 514 - 519 (1983)

- 83 Renoux, G.:

Immunopharmacologie et Pharmacologie du Diethyldithiocarbamate (DTC).

J. Pharmacol. (Paris) 13, 95 - 134 (1982)

- 84 Renoux, G., M. Renoux, J.M. Guillaumin, C. Gouzien:

Differentiation and Regulation of Lymphocyte Populations: Evidence for Immunopotentiator-Induced T-Cell Recruitment.

J. Immunopharmacol. 1, 415 - 422 (1979)

- 85 Rigas, D.A., C. Eginitis-Rigas, C. Head:

Biphasic Toxicity of Diethyldithiocarbamate, a Metal Chelator, to T-Lymphocytes and Polymorphnuclear Gra-

- nulocytes: Reversal by Zinc and Copper.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 88, 373 - 379 (1979)
- 86 Rigas, D.A., C. Eginitis-Rigas, R.H. Bigley, L. Stan-
kova, C. Head:
Biphasic Radiosensitization of Human Lymphocytes by
Diethyldithiocarbamate: Possible Involvement of Su-
peroxide Dismutase.
Int. J. Radiat. Biol. 38, 257 - 266 (1980)
- 87 Rowley, D.A., B. Halliwell:
Superoxide-Dependent Formation of Hydroxyl Radicals in
the Presence of Thiol Compounds.
FEBS Letters 138, 33 - 36 (1982)
- 88 Russell, G.R., E.J. Partick:
Effects of Variations in Nucleosides Pool Sizes on
Comparison of the Incorporation of [³H]Thymidine into
Isolated Rat Liver Cells.
Cancer Res. 40, 3717 - 3722 (1982)
- 89 Setlow, R.B.:
Repair; Different Basic Mechanisms in DNA Repair.
Arch. Toxicol. Suppl. 3, 217 - 228 (1980)
- 90 Sinclair, W.K.:
Hydroxyurea Revisited: A Decade of Clinical Effects
Studies.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 7, 631 - 637 (1981)
- 91 Skov, K.A., S. Berger, H. Adomat, B. Palcis, L.D.
Skarsgard:
Cellular Repair of Radiation-Induced Breaks in DNA.
Radiat. Res. 91, 388 (1982)

- 92 Solanto, M.V., M.D. Hamburg:
DDC-Induced Amnesia and Norepinephrine: A Correlated Behavioral-Biochemical Analysis.
Psychopharmacol. (Berlin) 66, 167 - 170 (1979)
- 93 Stefanini, M., L. Dalpra, G. Zei, R. Giorgi, A. Fas-
laschi, F. Nuzzo:
Incorporation of [³H]Thymidine Stimulated by Ultra-
violet Radiation into Human Fibroblast Cultures.
Mutat. Res. 34, 313 - 326 (1976)
- 94 Stone, D., P.S. Lin, L. Kwock:
Radiosensitization of Human Erythrocytes by Diethyl-
dithiocarbamate.
Int. J. Radiat. Biol. 33, 393 - 396 (1978)
- 95 Strömme, J.H., L. Eldjarn:
Distribution and Chemical Forms of Diethyldithiocar-
bamate and Tetraethylthiuram Disulfide (Disulfiram)
in Mice in Relation to Radioprotection.
Biochem. Pharmacol. 15, 287 - 297 (1966)
- 96 Sunderman, F.W.:
Chelation Therapy in Nickel Poisoning.
Ann. Clin. Lab. Sci. 11, 1 - 8 (1981)
- 97 Sunderman, F.W., L.M. Bibeau, M.C. Reid:
Synergistic Induction of Microsomal Heme Oxygenase
Activity in Rat Liver and Kidney by Diethyldithio-
carbamate and Nickel Chloride.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 71, 436 - 444 (1983)
- 98 Susic, V., R. Kovacevic, G. Masirevic:
Sleep-Waking Cycle and Behaviour after Diethyldithio-
carbamate in the Rat.
Arch. Int. Physiol. Biochim. 88, 37 - 45 (1980)

- 99 Tempel, K.:
Radiologie für Veterinärmediziner.
Stuttgart, Ferdinand Enke Verlag (1983)
- 100 Tempel, K.:
Unprogrammierte DNA-Synthese (DNA-Reparatur) in Milz-
und Thymuszellen der Ratte nach Einwirkung von UV-
Licht, Röntgenstrahlen oder Methylmethansulfonat in
vitro.
Z. Naturforsch. 35c, 106 - 111 (1980)
- 101 Tempel, K., M. Wulffius-Kock, J. Winkle, I. Schmerold:
Semikonservative und reparaturbedingte Desoxyribonu-
cleinsäuresynthese in Rattenthymozyten unter dem Ein-
fluß einiger radioprotektiver und radiosensibilisie-
render Verbindungen.
Strahlenther. 158, 112 - 122 (1982)
- 102 Tyrsted, G.:
Effect of Hydroxyurea and 5-Fluorodeoxyuridine on
Deoxyribonucleoside Triphosphate Pools Early in Phy-
tohemagglutinin-Stimulated Human Lymphocytes.
Biochem. Pharmacol. 31, 3107 - 3113 (1982)
- 103 Ungemach, F.R., D. Hegner:
Uptake of Thymidine into Isolated Rat Hepatocytes;
Evidence for Two Transport Systems.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 845 - 856 (1978)
- 104 Van Bekkum, D.W.:
The Protective Action of Dithiocarbamate against the
Lethal Effects of X-Irradiation in Mice.
Acta. Phys. Pharmacol. Neerl. 4, 508 - 523 (1956)
- 105 Van der Schans, G.P., H.B. Ceuten, P.H.M. Lohmann:

DNA Lesions Induced by Ionizing Radiation.
Progr. Mutat. Res. 4, 285 - 299 (1982)

- 106 Walker, I.G., J.P.H. Th'ng:
Excision-Repair Patch Size in DNA from Human KB
Cells Treated with UV-Light, or Methyl Methanesul-
fonate.
Mutat. Res. 105, 277 - 285 (1982)
- 107 Ward, J.F., E.J. Joner, W.F. Blakely:
Effects of Inhibitors of DNA Strand Break Repair on
HeLa Cells Radiosensitivity.
Cancer Res. 44, 59 - 63 (1984)
- 108 Wawra, E., E. Wintersberger:
Does Hydroxyurea Inhibit DNA Replication in Mouse
Cells by More than One Mechanism ?
Mol. Cell. Biol. 3, 297 - 304 (1983)
- 109 Weniger, P.:
An Improved Method to Detect Small Amount of Radia-
tion Damage in DNA of Eukaryotic Cells.
Int. J. Radiat. Biol. 36, 197 - 199 (1979)
- 110 Westman, G., J. Midander:
Post-Irradiation Diethyldithiocarbamate-Inhibition
of CuZn Superoxide Dismutase Reduces Clonogenic
Survival of Chinese Hamster V-79 Cells.
Int. J. Radiat. Biol. 45, 11 - 20 (1984)
- 111 Westman, G., S.L. Marklund:
Diethyldithiocarbamate, A Superoxide Dismutase Inhi-
bitor, Decreases the Radioresistance of Chinese
Hamster Cells.
Radiat. Res. 83, 303 - 311 (1980)

- 112 Wheeler, K.T., J.V. Wierowski:
DNA Accessibility: A Determinant of Mammalian Cell
Differentiation ?
Radiat. Res. 93, 312 - 318 (1983)
- 113 Williams, B.L., K. Wilson:
Praktische Biochemie.
Stuttgart, Georg Thieme Verlag (1978)
- 114 Winkle, J.:
Wirkung einiger radioprotektiver und radiosensibi-
lisierender Verbindungen auf die semikonservative
und unprogrammierte DNA-Synthese von Rattenthymo-
zyten.
Diss. med. vet. München (1981)
- 115 Yew, F.F.-H., R.T. Johnson:
Ultraviolet-Induced DNA Excision Repair in Human B
and T Lymphocytes. II. Effect of Inhibitors and DNA
Precursors.
Biochim. Biophys. Acta 562, 240 - 251 (1979)
- 116 Ying, T.S., D.S.R. Sarma, E. Farber:
Role of Acute Hepatic Necrosis in the Induction of
Early Steps in Liver Carcinogenesis by Diethyl-
nitrosamine.
Cancer Res. 41, 2096 - 2102 (1981)
- 117 Ying, T.S., D.S.R. Sarma, E. Farber:
The Sequential Analysis of Liver Cell Necrosis. In-
hibition of Diethylnitrosamine- and Dimethylnitros-
amine-Induced Acute Liver Cell Death by Posttreat-
ment with Diethyldithiocarbamate.
Amer. J. Pathol. 99, 159 - 170 (1980)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Tempel für die Überlassung des Themas und für die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

L e b e n s l a u f

Alfred Paul Spath	geb. am 13. April 1952 in Beckingen/Saar
Eltern	Robert Spath, Industriemeister Maria Spath, geb. Greis, verstorben 1972
Schulbesuch	1959 - 1963 Volksschule Beckingen 1963 - 1972 Staatl.Realgymnasium Dillingen/Saar
Abitur	17.05.1972
Wehrdienst	01.08.1972 - 30.10.1973
Studium	Okt.1973 - Sept.1974 Mathematik und Physik an der Universität Freiburg/Brag. Okt.1974 - Okt.1977 Forstwissenschaft an der Universität Freiburg/Brag. Nov.1977 - Dez.1982 Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Staatsexamen	09.12.1982
Approbation	14.03.1983
Dissertation	seit April 1983
Berufsausübung	von Mai 1984 bis Januar 1985 als Assistenztierarzt in einer Großtierpraxis seit 01.02.1985 wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Phar- makologie, Toxikologie und Phar- mazie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

